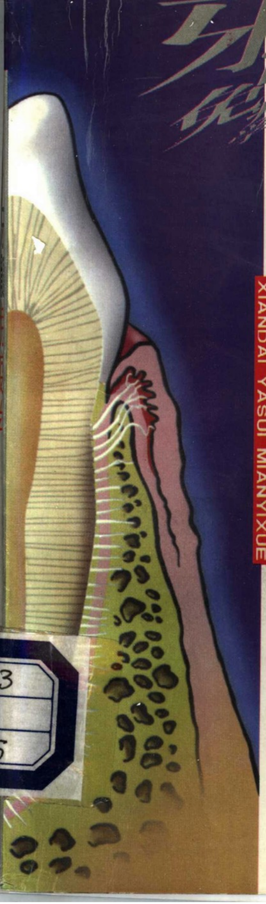


现代牙髓免疫学

XIANDAI YASUI MIANYIXUE



安徽科学技术出版社

VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

微信公众号

口 腔 视 频

微信搜索qzkqsp1即可关注

福利1

关注后可观看正畸、修复、种植等精彩内容

福利2

关注后领取口腔解剖病理学视频讲座全集

福利3

加入视频分享交流群，解答疑难病例，获取更多视频资源

扫二维码，关注公众号
领取更多口腔资料

责任编辑：王　颖
封面设计：王国亮



ISBN 7-5337-1625-6

ISBN 7-5337-1625-6/R · 328
定价：12.00元

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

现代牙髓免疫学

文玲英　吴海珍　编著

安徽科学技术出版社

PDG

皖新登字 02 号

责任编辑：王　颖
封面设计：王国亮

现代牙髓免疫学

文玲英　吴海珍　编著

*

安徽科学技术出版社出版
(合肥市跃进路 1 号新闻出版大厦)
邮政编码：230063
新华书店经销　　皖西日报社印刷厂印刷

*

开本：787×1092　1/32　印张：7.5　字数：160 千
1998 年 3 月第 1 版　1998 年 3 月第 1 次印刷
印数：2 000
ISBN7-5337-1625-6/R·328　定价：12.00 元

(本书如有倒装、缺页等问题向本社发行科调换)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

序

近年来，免疫学发展十分迅速，无论是在基础研究还是在实验技术方面均有许多令人振奋的新成就。诸如T细胞抗原受体本质及其基因结构，抗体的基因结构和抗体多样性的遗传基础，免疫应答过程中多种免疫细胞，免疫分子的相互作用及MHC限制性，免疫调节中独特型网络，神经内分泌免疫网络，多种免疫分子的发现及基因结构、相互间的信号传递、功能和网络，以及细胞工程技术、基因工程技术在免疫学中的应用等方面，都取得了令人瞩目的成果。免疫学在临床医学上所发挥的作用是人所公认的，从传染病的预防接种到揭示疾病的发病原因和机理，组织器官移植，疾病的诊断和免疫学治疗，以及免疫学研究方法等都在生物医学科学中被广泛应用。

免疫学已成为当今生物医学中一门重要的前沿学科，广泛渗透到各个领域，同时它也受到反渗透而迅速发展。口腔医学中，免疫学的理论和技术在揭示疾病的本质、诊断、预防和治疗等方面发挥着越来越重要的作用。作为医学免疫学的一个组成部分，牙髓免疫得到了飞速发展，分子生物学和免疫学研究的先进手段被及时地应用到牙髓免疫学的研究领域。如免疫分子检测、免疫标记技术、免疫印迹技术、免疫细胞及其功能检测、体内免疫学检测法、单克隆抗体技术、流式细胞术、质粒制备、重组质粒构建、限制性内切酶酶切分析、探针制备，真核细胞DNA、RNA的制备和分析，核酸序列测定、原位杂交及PCR技术等均被广泛应用；对牙髓、根尖周组织生理和

病理状态下的免疫机构、免疫机制，免疫应答水平和过程，以及参与免疫应答的细胞、免疫分子等，都有了系统性认识和很多新的发现。牙髓、根尖周疾病中大部分为细菌感染性疾患，在感染与抗感染过程中，决定其疾病转归的重要因素就是免疫应答的形式和水平，牙髓、根尖周疾病实际上就是一种免疫病理改变。因此，研究牙髓的免疫学对于深入探讨牙髓生物学特性、认识牙髓病的本质、防治牙髓病以及提高人类健康水平将起到积极作用。

第四军医大学口腔医学院的文玲英教授与她的研究生吴海珍等长期从事牙髓免疫学研究，在此领域内有较深的学术造诣。鉴于目前尚无有关牙髓免疫学方面的专著，为适应当今牙髓学发展的需要，作者广泛汇集有关文献，结合多年的科研成果编写了这本《现代牙髓免疫学》。

本书全面阐述了感染根管中的抗原，牙髓根尖周组织中的免疫细胞，牙髓中的细胞外基质、细胞因子、P物质和免疫反应基因相关肽神经纤维，牙髓、根尖周组织的免疫应答，免疫细胞化学在牙髓免疫学研究中的应用以及牙髓解剖生理特点等。本书可作为口腔医学专业研究生和本科生的教材，适合从事口腔医学专业的教学、临床、科研人员参考，是一部难得的教科书。该书的出版使我高兴地看到我国牙髓学研究水平已达到一个新的高度，欣慰之余，乐之为序。

史俊南

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

前　言

基础免疫学和分子生物学技术的进步，极大地推动了生物科学的发展。作为免疫学分支之一的牙髓免疫学，也获得了许多令人瞩目的突破性进展。牙髓、根尖周病变是由免疫应答参与的一种复杂的免疫病理性疾病，这已成为人们的共识。牙髓免疫学的研究成果为认识牙髓生物学特性增添了极其丰富的内容，势必对揭示牙髓病的本质和牙髓病的免疫学防治产生重大影响。在口腔医学界许多前辈和同行的启发、鼓励、支持下，我们综合了国内外有关文献和自己的研究成果，编写了此书，以反映当前牙髓免疫学的内容和主要进展，适应现代口腔医学迅猛发展的需要。

本书以基础理论为主，侧重阐述最新的研究成果。本书共分八章，绪论中从免疫学角度揭示了牙髓的特性；第二章系统地阐述了感染根管中的抗原成分；第三章至第六章介绍了牙髓中近年来发现的免疫细胞、细胞外基质、细胞因子、神经肽在正常和炎症状态下的分布、特性及生物学功能；第七章主要反映了牙髓、根尖周组织的免疫应答类型、场所和过程等。由于牙髓的解剖及组织学特性，免疫学定位、定量研究较其他组织、器官有一定的难度并具有特殊性，为此，第八章对我们应用成熟的牙髓标本制备、免疫组化和免疫电镜方法进行了详尽介绍。

本书可作为口腔医学专业研究生和大学本科生的教材，并可作为从事口腔医学教学、临床以及基础和临床科研、检验人员的参考书。

对于本书的编写，国内许多老前辈与同道给予了指点和帮助，史俊南教授欣然作序，石淑琴同志在盛夏酷暑里进行了精心编辑排版。安徽科技出版社王颖同志对此书的出版给予了大力支持，并提出了许多宝贵意见，在此一并表示衷心感谢。

在本书编写过程中，著者深感自身的知识和能力有限，也深知日新月异发展的免疫学之浩瀚，书中存在许多不尽如人意之处，我们真诚地希望广大读者提出宝贵的意见和建议，以便再版时修订。

文玲英　吴海珍

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

目　录

第一章　绪　论 …… 1
第二章　感染根管中的抗原 …… 6
　第一节　概　述 …… 6
　　一、抗　原 …… 6
　　二、抗原的种类 …… 6
　　三、抗原性物质应具备的条件 …… 7
　　四、抗原决定簇 …… 8
　第二节　病原微生物 …… 9
　　一、口腔内的微生物 …… 9
　　二、感染根管中的主要病原菌 …… 11
　　三、感染根管内微生物的协同作用 …… 14
　第三节　内毒素 …… 15
　　一、内毒素的免疫原性 …… 16
　　二、内毒素的生物学活性 …… 16
　　三、LPS 结合蛋白受体 …… 21
　　四、根管病原菌内毒素的作用 …… 22
　第四节　异嗜性抗原和修饰的自身抗原 …… 25
　　一、异嗜性抗原 …… 25
　　二、修饰的自身抗原 …… 26
　主要参考文献 …… 28
第三章　牙髓的免疫细胞 …… 31

第一节 免疫细胞的名称和分类 …… 31
一、免疫细胞和免疫活性细胞 …… 31
二、免疫细胞的分类 …… 31
第二节 T细胞和B细胞 …… 32
一、T细胞和B细胞的来源 …… 32
二、T细胞和B细胞的区别 …… 32
三、T细胞亚群 …… 33
四、B细胞亚群 …… 35
五、牙髓中的T、B细胞和T细胞亚群 …… 36
第三节 单核吞噬细胞和树突状细胞 …… 39
一、单核吞噬细胞 …… 40
二、树突状细胞 …… 42
三、牙髓中的Ia抗原表达细胞 …… 42
第四节 其他免疫细胞 …… 44
一、肥大细胞 …… 45
二、中性粒细胞和嗜酸粒细胞 …… 48
三、血管内皮细胞 …… 48
第五节 免疫细胞间的相互作用 …… 55
一、巨噬细胞与T细胞间的相互作用和调节 …… 55
二、T_H细胞对B细胞的辅助作用 …… 56
三、T_S细胞的免疫调节作用 …… 57
主要参考文献 …… 58
第四章 牙髓中的细胞外基质 …… 61
第一节 胶原 …… 62
一、胶原的结构、组成和分类 …… 62
二、胶原的来源与作用 …… 64
三、人牙髓组织中的胶原 …… 64
第二节 纤维粘连蛋白(FN) …… 65

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

一、FN 的组成和存在形式 …………………………………… 65
二、FN 的生理功能 ……………………………………………… 67
三、FN 在牙髓中的分布和作用 ………………………………… 68
第三节　层粘连蛋白和体外结合素 ……………………………… 70
一、层粘连蛋白的结构 …………………………………………… 70
二、层粘连蛋白的生物学作用 …………………………………… 71
三、体外结合素和硫酸软骨素 …………………………………… 72
第四节　细胞外基质在牙齿发生、发育过程中的作用 ……………………………………………… 73
一、FN 在成牙本质细胞分化期间的分布特征与作用 …… 74
二、Ⅱ型胶原在成牙本质细胞分化期间的分布特征与作用 ………………………………………………… 74
主要参考文献 ……………………………………………………… 75
第五章　细胞因子 ………………………………………………… 77
第一节　细胞因子的分类和共同特性 …………………………… 77
一、根据产生细胞因子的细胞种类进行分类 ………………… 77
二、根据细胞因子的主要功能分类 …………………………… 78
三、细胞因子的共同特性 ………………………………………… 80
四、细胞因子网络作用 …………………………………………… 81
第二节　白细胞介素(IL) ………………………………………… 82
一、白细胞介素-1(IL-1) ……………………………………… 82
二、白细胞介素-2(IL-2) ……………………………………… 87
三、白细胞介素-3(IL-3) ……………………………………… 87
四、白细胞介素-4(IL-4) ……………………………………… 87
五、白细胞介素-5(IL-5) ……………………………………… 88
六、白细胞介素-6(IL-6) ……………………………………… 88
七、白细胞介素-8(IL-8) ……………………………………… 91
第三节　肿瘤坏死因子(TNF) …………………………………… 92

一、TNF 的产生和分类 …… 92
二、TNF 受体 …… 93
三、TNF 的生物学作用 …… 94
四、TNF 在牙髓尖周病中的作用 …… 98
第四节 血小板衍生的生长因子(PDGF) …… 100
一、PDGF 的存在方式和来源 …… 100
二、PDGF 的受体 …… 101
三、PDGF 的生物学功能 …… 102
四、PDGF 在创伤修复中的作用 …… 103
五、PDGF 对牙髓、牙周成纤维细胞的作用 …… 103
第五节 表皮生长因子(EGF) …… 104
一、EGF 的产生 …… 105
二、EGF 的受体 …… 106
三、EGF 的生物学效应 …… 106
四、EGF 对组织修复的影响 …… 108
五、EGF 对牙髓细胞的作用 …… 110
第六节 转化生长因子-β(TGF-β) …… 111
一、TGF-β 的产生 …… 112
二、TGF-β 的受体 …… 113
三、TGF-β 的生物学功能 …… 114
四、TGF-β 对组织修复的作用 …… 117
五、TGF-β 在牙齿胚胎发育过程中的作用 …… 119
六、TGF-β 对牙髓细胞的作用 …… 120
第七节 骨形成蛋白(BMP) …… 122
一、BMP 的分布和功能 …… 123
二、牙胚发育中的 BMP …… 124
三、牙本质基质蛋白 …… 125
四、BMP 在牙髓修复中的作用 …… 125

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

五、微环境对 BMP 诱导作用的影响 …… 127
六、BMP_3 的有关研究 …… 127
第八节　成纤维细胞生长因子(FGF) …… 129
一、FGF 的分类和产生 …… 130
二、FGF 受体 …… 130
三、FGF 的生物学作用 …… 131
四、FGF 在创伤修复中的作用 …… 131
第九节　胰岛素样生长因子(IGF) …… 134
一、IGF 的合成和分泌 …… 134
二、IGF 受体 …… 135
三、IGF 的生物学作用 …… 135
四、IGF 在牙胚发育中的作用 …… 135
第十节　凝血因子Ⅷ …… 136
一、凝血因子Ⅷ的产生和存在形式 …… 136
二、凝血因子Ⅷ的功能 …… 136
三、内皮细胞的作用 …… 137
四、牙髓中的凝血因子Ⅷ …… 137
主要参考文献 …… 138
第六章　牙髓的神经和神经肽 …… 146
第一节　神经递质和神经肽 …… 147
一、SP 的生物学特性、分布和生理作用 …… 148
二、CGRP 的生物学特性、分布和生理作用 …… 149
第二节　牙髓中的神经肽 …… 150
一、牙髓感觉神经中的神经肽 …… 151
二、牙髓交感神经中的神经肽 …… 153
三、牙髓副交感神经中的神经肽 …… 153
第三节　牙髓神经肽的生物学功能 …… 154
一、参与血流调节 …… 154

二、参与疼痛传导 …… 155
三、参与免疫调节、炎症介导和修复过程 …… 156
主要参考文献 …… 162
第七章 牙髓的免疫应答 …… 165
第一节 免疫应答的类型和产生场所 …… 165
一、免疫应答的类型 …… 165
二、免疫应答的产生场所 …… 166
第二节 免疫应答的过程 …… 167
一、感应阶段 …… 167
二、反应阶段 …… 169
三、效应阶段 …… 170
第三节 牙髓的免疫应答 …… 172
一、体液免疫应答 …… 173
二、细胞介导免疫 …… 174
三、牙髓的变态反应 …… 175
第四节 尖周组织的免疫应答 …… 179
一、引起尖周组织免疫病理的抗原物质和免疫成分 …… 179
二、尖周组织的病理性免疫应答 …… 181
三、尖周组织的炎性细胞和病变类型 …… 183
四、根管渗出液的抗体成分和细胞因子 …… 184
五、尖周病变中的破骨细胞 …… 188
主要参考文献 …… 189
第八章 免疫细胞化学在牙髓免疫学研究中的应用 …… 191
第一节 牙髓免疫细胞化学技术 …… 193
一、牙髓免疫细胞化学技术的标本制备 …… 193
二、牙髓免疫细胞化学染色法 …… 203
三、牙髓免疫细胞化学染色的常用试剂 …… 208
四、牙髓的免疫电镜技术 …… 213

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第二节　原位杂交组织化学 …………………………… 216
一、杂交前准备 …………………………………… 217
二、杂交反应 ……………………………………… 220
三、杂交后处理 …………………………………… 222
四、显示 …………………………………………… 222
五、原位杂交的对照试验 ………………………… 222
六、原位杂交组织化学与免疫组织化学双标记技术 …… 223
主要参考文献 ……………………………………… 224

第一章　绪论

牙髓组织是一种胚胎性的疏松结缔组织，由细胞、细胞间质、末端血管、淋巴管和神经所组成，位于人体最坚硬的组织——牙釉质的包围之中，正常情况下极少受到生物力的作用。然而，坚硬外壳的包裹，并不能使牙髓免受外界刺激因子的伤害。细菌、真菌和病毒等致病微生物，物理性、化学性和放射性等刺激物都可能有机会伤害到牙髓，其中最常见的是细菌性致病因子的侵袭。

人类经历了600万年左右之遥的漫长繁衍和进化，在防御外界有害因子的侵袭以及与之不断地斗争中，发展形成了各种特有的免疫防御机构及功能。牙体硬组织除承担咀嚼等主要功能外，同时也构成了一道坚固的非特异表面防御屏障。然而这个表面屏障并非"固若金汤"，不可能完全抵御外界刺激物对牙髓的侵袭，如釉质的某些发育缺陷，釉板、釉牙骨质界处的牙本质裸露等均可成为致病因子入侵的通道。在龋蚀、牙周病、牙体硬组织损伤和发育畸形以及医源性损伤等情况下，牙髓必然受到侵袭，受侵袭的牙髓也必然出现防御性保护反应。对于保护整个机体而言，牙髓又可被视为位于牙体硬组织表面屏障之后的第二道防御屏障。牙髓的基本功能是形成牙本质，提供营养、牙齿感觉，同时具有一定的修复防御能力等。其中，当牙齿受到损害后，在损害的相应区域沉积修复性牙本质又是牙髓区别其他组织的特征。修复性牙本质，或反应

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

性牙本质便是牙髓对慢性损伤的一种防御性反应。更重要的是牙髓还具有非特异性的抗感染免疫机构和特异性免疫成分，富含免疫活性细胞、免疫分子等等。牙髓的免疫防御能力是完善而有效的。牙髓细胞除主体的牙髓细胞以外，还有防御细胞，包括组织细胞、未分化间叶细胞和免疫细胞，这些细胞在牙髓受到刺激就活跃起来，可吞噬细菌并清除炎症产物。少量进入牙髓中的细菌通常会很快地被防御细胞清除。在菌血症状态下，牙髓中的细菌数与牙髓病变程度成正比。牙髓的血液循环受损坏死后，很快会出现坏疽，即所谓集菌作用。可以认为，集菌作用的实质就是牙髓丧失了部分或全部免疫防御能力的具体表现。

牙髓的免疫防御能力既是完善的，又是有限的，有限的防御能力并非是牙髓组织本身"娇嫩"的缘故，而在于它所处的特殊解剖环境和过少的组织量。当牙髓感染后发生不可逆性炎症时，往往是受到相对于自身组织量而言大量病原微生物侵袭的结果。龋病最直接的并发症便是牙髓炎症。由于龋病多是牙体硬组织的慢性病变，故龋源性牙髓炎症多数情况下是慢性、持续性炎症。在龋病微生物的持续作用下，一方面在其相应的牙髓内形成修复性牙本质；另一方面，若龋病侵入牙本质深层近髓时，牙髓内可有明显而轻度的炎症，炎症区内有巨噬细胞、淋巴细胞和产生抗体的浆细胞等免疫细胞聚集，并可有多形核白细胞浸润，从而造成牙髓组织的免疫病理变化。龋病进一步发展穿通牙髓时，大量病原微生物的侵入加剧了牙髓的免疫应答，其免疫应答除了表现为消除病原微生物、终止感染等对机体有利的一面外，也能表现为对微生物感染产生的免疫损伤的有害一面。在免疫保护效应的情况下可伴有

严重的免疫损伤，在免疫损伤的同时亦可伴有免疫保护效应。牙髓感染后的病理表现一方面受病原微生物本身的影响，另一方面亦受制于机体或组织的因素，两个方面的因素决定着免疫保护效应和免疫损伤效应间的平衡。因此，牙髓免疫学研究的意义就在于明确牙髓免疫的机制并启动免疫保护效应，最终达到预防和治疗牙髓病的目的。

外界刺激是否造成牙髓损伤，以及造成的损伤程度如何，除了取决于牙髓的免疫防御能力、免疫应答形式和强度之外，与牙髓组织的解剖和生理特性有密切关系。曾经认为，位于髓腔内的牙髓组织在炎症时，因其缺乏侧支循环，血管壁薄，易于扩张和充血、渗出，髓腔内压力增高，导致血循环障碍，而出现坏死，即所谓“自身扼杀”。事实上，牙髓不仅血液供应丰富，而且具有许多血流调节机构，牙髓特殊的血管结构是动-静脉吻合、静-静脉吻合和“u”形环状小动脉。牙髓中还存在有大量的侧副根管中的牙髓交通支和根尖侧支血管，均参与血流调节。此外，还有一个重要的调节机制就是细胞的微饮液作用。当龋洞下方牙髓血管出现炎症改变时，周围 1～2mm 外的组织压基本无变化，炎症区血管渗出物致局部组织压增高，但周围正常的细静脉能吸收组织液，从而保证整个牙髓的组织压不至于升高。这就是不能“膨胀”的牙髓组织抵抗水肿的一种特殊保护措施。研究证实，实验性冠髓炎时，根髓的血流实际上并无变化。大量临床也证实，局限性冠髓炎症，进行活髓切断术后，根髓仍能长期保持健康状态。因此，“自身扼杀”理论并不能成立。当牙髓遭受大量病原微生物侵袭，大量抗原物质进入时，超出了牙髓的抵御能力或出现变态反应，牙髓才发生不可逆性的严重改变。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

牙髓的免疫防御能力还受到年龄因素的制约。牙髓的增龄变化是一种生物学过程，和人体其他组织器官一样，对疾病的易感性逐渐增高。牙髓的增龄变化非常显著，萌出不久的牙髓，牙根尚未完全形成，髓腔大，根尖孔敞开，牙髓组织中细胞多，血管丰富。随着年龄增大，继发性牙本质逐渐沉积，髓腔逐渐缩小，牙髓细胞成分和血管减少，纤维密度增加，组织活力降低，发生种种退变等。因此，牙髓免疫防御能力不但受到特定的解剖条件的限制，而且与牙髓组织的自身变化密切相关。免疫防御能力是在个体发生、发育过程中逐渐完善的，儿童的免疫应答水平低于成年人，乳牙牙髓的免疫同样也较恒牙低。临床上可以看到，乳牙发生牙髓炎不久，便出现根尖周病变，产生较成人严重的全身反应。其主要原因之一就是乳牙牙髓的免疫防御能力不能有效地阻止微生物等致病因子向纵深的侵袭。另一方面，乳牙根尖周病变出现后，多数牙髓仍具有活力，这同时也提示，乳牙牙髓内出现变态反应等免疫病理损害的可能性较恒牙小。

牙髓防御屏障破坏后，根尖周组织便承担起防御功能，它也是抵御外界刺激因子通过牙齿进入机体的最后一道屏障。从牙齿表面硬组织、牙髓到根尖周组织之所以层层设防，是因为通过牙体表面、根管途径进入机体的感染机会很多。就根尖周牙槽骨而言，遭受感染的机会是全身骨骼组织中最高的。根尖周组织的血液供应非常丰富，解剖学环境远优于牙髓组织，能较好地清除抗原性物质和炎性产物。同时，更容易出现免疫病理性改变。诸多研究结果证明，根尖周病变就是根尖周组织对入侵的抗原物质的免疫应答表现形式，但其本质都是防御性的。尽管尖周组织的免疫应答是机体对根管系统的抗原所

产生的可使病变局限的一种保护性反应，但邻近组织的破坏是不可避免的，因而常导致尖周组织的破坏。由牙髓炎症发展而来的尖周炎症多是慢性炎症，慢性尖周炎的病理解剖特征是尖周组织增殖性炎症变化，即纤维和肉芽组织的形成，以及牙周间隙形态改变。慢性尖周炎的病变类型有尖周肉芽肿、尖周脓肿和尖周囊肿。目前认为，慢性尖周炎是机体对根管系统抗原的免疫病理反应性或变态反应性疾病。尖周病变是病理性免疫反应的结果。

免疫反应的必需成分是抗原。通过根管系统引起尖周组织免疫反应的抗原物质有：聚积于根管内活的或死亡的口腔细菌、细菌毒素、感染变性坏死的牙髓组织及其分解产物，或牙髓治疗药物半抗原与牙髓蛋白结合形成的抗原物质。这些物质不断通过根尖孔进入尖周组织，引起局部或机体的免疫反应。为此强调，只有将根管系统中的抗原物质彻底清除干净，尖周组织的免疫反应才可终止。因此，进行根管机械、化学预备，从根管内清除抗原物质，仍然是根管治疗术中最重要的方法。当根管内抗原物质消除之后，被破坏的组织才能得以修复。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第二章　感染根管中的抗原

第一节　概述

一、抗原(Antigen，Ag)

过去认为，凡能刺激机体产生抗体，并能与抗体发生特异性结合的物质称为抗原。目前认为，抗原是一类能刺激机体免疫系统产生特异性免疫应答，并能与相应的免疫应答产物在体内或体外产生特异性结合的物质。

抗原应具有两种特性，即免疫原性(Immunogenicity)和反应原性(Reactinogenicity)。免疫原性是指抗原刺激机体引起具有高度特异性的免疫应答；反应原性是指抗原与相应的免疫应答产物产生特异性结合。

二、抗原的种类

1. 完全抗原(Complete antigen)

既具有免疫原性又有反应原性的物质称为完全抗原，或免疫原(Immunogen)，如大多数蛋白质、细菌、病毒等。

2. 不完全抗原(Incomplete antigen)

仅具有反应原性而无免疫原性的物质称为不完全抗原，或半抗原(Hapten)，如大多数多糖、类脂、某些药物等。有些

简单的有机分子(分子量小于 4000),单独无免疫原性,当与蛋白质载体(Carrier)结合后才具有免疫原性。免疫原性即指抗原性(Antigenicity),是具有引起免疫反应性能的抗原。

免疫原同时又是抗原,而抗原并不一定是免疫原。

三、抗原性物质应具备的条件

1. 异种异体物质

正常情况下,具有抗原性的物质必须是异种或者至少是同种异体物质。该物质与机体的种系关系愈远,其抗原性就愈强,机体的免疫反应也更强。例如鸭血清蛋白对鸡的免疫性较弱,而对家兔则能引起较强的免疫反应。各种病原微生物、动物血清等对人是良好的强抗原。

一般说来,机体自身的物质或细胞不具抗原性,但在物理、化学或感染因素的影响下,抗原结构发生改变,也会被机体视为异己物质而产生免疫反应。此具有抗原的自身物质称为自身抗原(Autoantigen),所产生的抗体称为自身抗体(Autoantibody)。

自身抗原可刺激免疫系统发生特异性免疫应答而导致自身免疫性疾病。

在胚胎期从未与淋巴细胞接触过的自身物质,如甲状腺球蛋白、眼晶体蛋白和精子等因外伤、手术等原因误入血流时,如同异物一样,也能引起免疫应答。

2. 大分子胶体

有效的免疫原通常是结构复杂的可溶性大分子胶体,分子量在 10 000 以上。分子量越大,抗原性越强。在有机物中,蛋白质的抗原性最强,某些复杂的多糖也具有抗原性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

大分子胶体抗原性较强的原因是：①大分子胶体物质化学结构较稳定，不易被破坏和清除，在体内停留时间长，能使淋巴细胞得到较持续的刺激。②分子量越大，表面的抗原决定簇就越多，而淋巴细胞要有一定数量抗原决定簇的刺激才能活化。

抗原物质表面必须具有一定的化学组成和结构。抗原与机体之间的种系关系相距越远、组织结构差异性越大，抗原性越强。

四、抗原决定簇(Antigenic determinant)

抗原决定簇是指存在抗原表面决定抗原特异性的化学基团，又称表位(Epitop,E)，它可决定刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞的特异性，并能与相应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应。因此，抗原决定簇是被免疫细胞识别的标志和免疫反应具有特异性的物质基础。各种抗原物质各有其特异的抗原决定簇。一个抗原分子可具有一种或多种不同的抗原决定簇，其特异性由抗原决定簇的性质、数目和空间构象所决定。

有时两种不同的抗原中共同具有一种相同或相似的抗原决定簇，此称为共同抗原(Common antigen)。具有共同抗原的物质刺激机体产生抗体，可以和另一物质的相同决定簇结合，此称为交叉反应。一种决定簇的相应抗体，也可与构型相似的另一决定簇发生交叉反应。

抗原的来源繁多，分类不一，感染根管中的抗原主要有：病原微生物及其毒素、异嗜性抗原和修饰的自身抗原。

第二节　病原微生物

一、口腔内的微生物

口腔内微生物的种类和数目很多，除了种类繁多的细菌外，还有真菌、支原体和病毒等。这些微生物在口腔内不同部位共栖，竞争或拮抗，与宿主口腔健康密切相关。

1. G^+球菌中的葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、**链球菌属**

链球菌属包括：

化脓性链球菌（*Streptococcus pyogennes*）

变形链球菌（*Streptococcus mutans*）

血链球菌（*Streptococcus sanguis*）

唾液链球菌（*Streptococcus salivarius*）

轻链球菌（*Streptococcus mitior*）

米勒链球菌（*Streptococcus milleri*）

粪链球菌（*Streptococcus faecalis*）

消化球菌和消化链球菌（*Peptococcus and Peptostreptococcus*）

2. G^-球菌

奈瑟菌属（*Neisseria*）

韦荣球菌属（*Veillonella*）。

3. G^+杆菌

棒状杆菌属（*Corynebacterium*）

丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

乳杆菌属(*Lactobacillus*)

放线菌属:伊氏放线菌(*A. israelil*)、粘性放线菌、内氏放线菌(*A. neaslundiil*)

真杆菌属(*Eubacterium*)

芽胞杆菌属(*Bacillus*)

梭菌属(*Clostridium*)

诺卡菌属(*Nocardia*)

4. G^-杆菌

类杆菌属(*Bacteroides*)

梭杆菌属(*Fusobacterium*)

汗毛菌属(*Leptotrichia*)

月形单胞菌属(*Selenomonas*)

厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)

嗜血杆菌属(*Haemophilus*)

放线杆菌属(*Actinobacillus*)

沃廉菌属(*Wolinella*)

艾肯菌属(*Eikenella*)

弯曲杆菌属(*Campylobacter*)

二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)

它们大多数为口腔常居菌,为需氧、兼性厌氧或厌氧菌,其中有的菌与菌斑形成、根面龋、龋病、牙周病的发生、发展有一定关系,有的菌与口腔疾病关系至今仍不清楚,尚待于研究。

5. 其他微生物

螺旋体(*Spirochaeta*)

支原体(*Mycoplasma*)

病毒(*Virus*)

真菌(*Fungi*)

二、感染根管中的主要病原菌

由于龋病是常见病和多发病,与牙髓、尖周病关系密切的主要是龋洞和牙菌斑中微生物及其毒素的抗原物质。而感染根管中的病原微生物是以厌氧菌包括专性厌氧菌和兼性厌氧菌为主体的混合菌属,其厌氧菌又以 G^- 杆菌的类杆菌属为主。

感染根管中的主要病原菌是口腔类杆菌中的产黑色素类杆菌属。口腔类杆菌一般根据能否产生黑色素分为两大类,一类为产黑色素群,另一类为不产黑色素群。其中产黑色素类杆菌群(*Bacteroides melaninogenicus*)与牙髓、尖周和牙周疾病关系最大,是混合菌群中的重要病原菌。Sundguist(1980)曾在所有根尖周骨质破坏和伴有疼痛的感染根管中证实有产黑色素类杆菌,90 %以上牙源性脓肿的标本均可分离到产黑色素类杆菌群,而无疼痛症状者则无此菌。

产黑色素类杆菌是一类 G^- 专性厌氧菌,为不可动的短杆状或球杆状菌,在血琼脂平板上生长时可产生黑色素或棕黑色素。此黑色是由于羟基血素的衍生物造成的。大多数菌株需要氯化血红素(1.5μg/ml)或维生素 K(1.0μg/ml),或两者都需要,以促进生长。随着人们对 G^- 杆菌在牙髓、尖周和牙周病的病因和发病机理方面作用的日益重视,特别是对产黑色素类杆菌的研究在不断深入,此类细菌的分类一直在变动。

最早,1962 年,Sawyer 将产黑色素类杆菌分为三类:①

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

不解糖类杆菌(*B. melaninogenicus subsp. asaccharolyticus*)，不发酵碳水化合物，解脱。② 中间型类杆菌(*B. melaninogenicus subsp. intermedius*)，弱发酵，仅发酵某些碳水化合物，可解脱。③ 产黑色素型类杆菌(*B. melaninogenicus subsp. melaninogenicus*)，强发酵，发酵一些碳水化合物，不解脱。表2-1 列出了口腔中产黑色素类杆菌的主要鉴别特征。

表 2-1　口腔中产黑色素类杆菌的主要鉴别特征

	不解糖类	中间型类	产黑色素类
葡萄糖	—	+	+
乳糖	—	✓	+
半乳糖	—	✓	+
蔗糖	—	✓	+
甘露醇	—	✓	+
淀粉水解	—	+	+
七叶灵水解	—	—	✓
靛基质	+	+	—
蛋白分解	+	+	—
3-羟基丁酮	✓	—	✓
H_2S 产生	✓	✓	—
硝酸盐还原	✓	—	—
NA 中 G+C (mol/L)	4.6～5.0	4.1～4.4	3.6～4.0
促进生长物	氯化血红素，胃液	氯化血红素	氯化血红素

产黑色素类杆菌的共性为：黑色菌落，紫外波长 380nm 处可见红色荧光；动力—，尿素—，明胶液化＋。

目前，根据以人类和动物中分离出的产黑色素类杆菌的不同生化特性和遗传特性，将三大类亚种的产黑色素类杆菌

继续延伸。

(1)从不解糖亚种延伸出：

牙龈类杆菌(*B. gigivalis*，*Bg*)，目前称牙龈卟啉菌(*Pg*)。

牙髓类杆菌(*B. endodontalis*，*Be*)，目前称牙髓卟啉菌(*Pe*)。

不解糖类杆菌(*B. asaccharolyticus*，*Ba*)，目前称不解糖卟啉菌(*Pa*)。

内氏类杆菌(*B. levii*)。

(2)从中间型亚种延伸出：

中间类杆菌(*B. intermedius*，*Bi*)，目前称中间普氏菌(*Pro. i*)。

躯体类杆菌(*B. corporis*，*Bc*)，目前称躯体普氏菌(*Pro. C*)。

(3)从产黑色素亚种延伸出：

产黑色素普氏菌(*Pro. m*)。

卢氏类杆菌(*B. loescheii*. *BI*)，目前称卢氏普氏菌(*Pro. l*)。

齿垢类杆菌(*B. denticola*，*Bd*)，目前称齿垢普氏菌(*Pro. d*)。

其中牙龈类杆菌毒力最强，中间类杆菌分离率最高。在80年代，牙龈类杆菌一直被作为产黑色素类杆菌群中的一个独立菌种，并根据其毒力特性分为几个型。

1988年，Shan 和 Collins 提出，牙龈类杆菌、牙髓类杆菌、不解糖类杆菌等三株不解糖的产黑色素不解糖的类杆菌可组成一群相对溶血的菌群，它们在生化、化学特征上与类杆

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

菌属的典型菌株有着明显的差异，并将这三株细菌重新分类为紫叶啉菌属，将牙龈类杆菌命名为牙龈卟啉菌，所以牙龈卟啉菌(*Pg*)和牙龈类杆菌(*Bg*)、牙髓卟啉菌(*Pe*)和牙髓类杆菌(*Be*)、不解糖卟啉菌(*Pa*)和不解糖类杆菌(*Ba*)实际上是异名同菌。

最近发现中间类杆菌、躯体类杆菌、产黑色素类杆菌、卢氏类杆菌和齿垢类杆菌等与类杆菌属有差异，也已划出类杆菌属而独立成一个新属——普氏菌属(*Provotella*)。至今，产黑色素菌群已独立出两个新属，即紫卟啉菌属和普氏菌属，并分为10多个菌种。现以证明，在10多个菌种中，牙龈卟啉菌可通过膜泡的多种作用，有效地逃避宿主免疫细胞的吞噬功能，抵抗血清的杀菌活性，损害宿主的防御机制，是牙髓、尖周病的重要病原菌，已经成为口腔微生物学中重点研究的厌氧菌之一。

由于产黑色素类杆菌产生的脂多糖不同于其他G^-兼性厌氧菌产生的脂多糖，它们更具有毒性和免疫学活性，因此，感染根管内病原微生物的抗原性主要体现为内毒素的作用。

三、感染根管内微生物的协同作用

感染根管内的菌群是以厌氧菌为主体的混合感染菌群。在感染根管内的微生物中，细菌的协同作用可能是牙源性感染的关键因素。非致病共生菌提供了生长因素，同时也通过它们的代谢产物降低了氧化还原电位，给感染创造一个更为合宜的环境。

纯培养的黑色素类杆菌无致病性，当与其他细菌混合感染时方显致病性，其致病力可由于其他细菌的存在而增强。例

如将纯培养的产黑色素类杆菌或脆弱类杆菌注射到实验动物皮下并不引起感染，但与其他细菌，如需氧菌、韦氏菌、消化链球菌等一起注射时就可引起严重感染。这是因为产黑色素类杆菌的大多数菌株生长需血素，多数菌株需要萘醌，这需要活体中口腔内其他常居菌的供给，所以产黑色素类杆菌的致病能力由于其他菌的存在而增强。又如脆弱类杆菌，它可产生溶解胶原的酶，而活体中的其他细菌则可利用胶原酶的终末产物。因此，细菌间相互作用和共生作用在根管内混合感染中具有重要意义。

第三节 内毒素

G^-菌是感染根管的优势菌，G^-菌的抗原主要是菌体抗原，其菌体抗原的有效成分为内毒素(Endotoxin，ET)，因此，内毒素是其中的主要致病原或免疫原。

内毒素是菌体的结构成分，是一类具有高度生物活性的物质，其化学成分为磷脂-多糖-蛋白质(Phospholipid-Polysaccharide-Protein)复合物。细胞壁中的脂多糖(Lipopolysaccharide，LPS)是内毒素的主要成分。LPS是由O特异性多糖、非特异性核心多糖和类脂A三部分组成的。其中类脂A为一种特殊糖磷脂，是LPS的核心成分，所有LPS的活性基团几乎都集中在类脂A上。

类脂A具有内毒素的主要毒性，而多糖位于细菌细胞壁的最外层，与细菌的特异性有关。各种G^-菌的类脂A的化学成分和结构虽有差异，但极相似，无种属特异性。故不同的G^-菌感染时，由内毒素引起的毒性作用大致相同。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

一、内毒素的免疫原性

机体免疫反应是抗原和一个复杂的细胞系统间相互作用而诱发的。作为异质性大分子的内毒素有很强的免疫原性，其分子上三个性质不同的区域，分别产生三种不同类型的抗体，即抗 O 侧链抗体、抗核心多糖抗体和抗类脂 A 抗体。决定免疫特异性的抗原决定簇携带在 O 多糖侧链上，大部分的抗体就是针对它形成的。抗 O 抗体的保护作用很强，但只限于对同型菌株有效。核心区和类脂 A 区与不同种属有免疫学交叉反应，试图用于临床免疫治疗的抗内毒素抗体就是针对这部分的。用整菌体以及纯内毒素免疫，主要形成 IgM 抗体。通过反复免疫，IgM 和 IgG 都能诱发出来。如果用不同途径处理，则分泌液中有 IgA，但没有 IgE 抗体。

内毒素具有抗原性，但内毒素 LPS 是非胸腺依赖抗原，能直接激活 B 细胞，产生的抗体无中和作用，用甲醛液处理不能形成类毒素。

二、内毒素的生物学活性

内毒素的生物学活性是多方面的，其中主要是它的毒性和免疫学活性。

1. 内毒素的毒性

内毒素进入血循环后可立即与体液成分和细胞成分起作用。与细胞成分起作用，产生有毒的中间产物，或使细胞粘附聚集，或致膜损伤和细胞溶解；与体液成分起作用，形成的中间产物又可影响细胞成分的功能变化和加剧体液成分的改变。因此，内毒素与体液、细胞成分的相互作用是极为复杂的，

其毒性作用的表现是导致机体出现一系列的病理生理改变。临床出现的症状往往也是机体多数组织器官出现变化的综合表现，例如，发热反应、内毒素血症与内毒素休克、血管舒缩机能紊乱、弥漫性血管内凝血(Disseminated intravascular coagulation,DIC)和施瓦兹曼现象 (Shwartzman phenomenon)等。

1)发热反应　人体对内毒素的致热反应极为敏感，1～5ng/kg 即可引起发热。一般在注射后 2h 内体温上升，维持 4h 左右。现已证明，按每公斤体重的最小致热剂量比较，人和家兔的内毒素致热剂量大致相等，人和家兔的热反应阈值大致相当。

2)内毒素血症与内毒素休克　当大量内毒素至血液时，则可引起内毒素血症。因内毒素可作用于血小板、白细胞、补体系统、激肽系统等，引起组织胺、5-羟色胺、前列腺素、激肽等血管活性介质释放，使小血管收缩和舒张功能紊乱而导致微循环障碍，致使有效循环血量减少，血压下降，严重时则形成以微循环衰竭和低血压为特征的内毒素休克。

3)弥漫性血管内凝血(DIC)　是由于内毒素激活凝血系统，包括内源性凝血途径和外源性凝血途径，使血液凝固异常升高，生成大量纤维蛋白沉积于微循环内形成栓塞所致。施瓦兹曼现象则可能是由内毒素引起 DIC 的一种特殊形式。

2. 内毒素的免疫学活性

内毒素的免疫学活性主要表现在内毒素能刺激机体的免疫系统激活补体和各种吞噬细胞，并诱导靶细胞释放各种细胞因子而发挥作用。

1)内毒素激活补体系统　内毒素可经经典和替代途径激

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

活补体，活化的补体可使粒细胞、单核细胞和内皮细胞激活。粒细胞经由补体激活后，可导致：①发热的介质释放；②溶酶

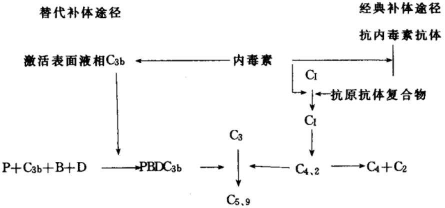


图 2-1　内毒素和补体系统的相互作用

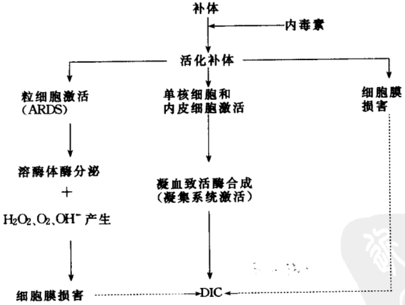


图 2-2　内毒素作用于血液凝集系统的可能途径

体酶的分泌；③产生过氧化阴离子、过氧化氢和氢氧基等，后者对早期 G^- 菌感染中细菌的破坏很重要。但这些粒细胞的产物可造成血管壁的严重损害，使膜通透性增加，随之出现水肿，进而由于中性粒细胞凝集，微循环出现严重变化，导致各种组织器官的功能改变(图 2-1，2-2)。

2）*内毒素作用靶细胞释放细胞因子* 内毒素作用的靶细胞有单核-巨噬细胞、B淋巴细胞、粒细胞、血小板、成纤维细胞、内皮细胞等，其中单核-巨噬细胞是内毒素作用的主要靶细胞。

实验研究证明，内毒素作用于靶细胞，诱导其分泌多种细胞因子，其中主要有肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)、集落刺激因子(CSFs)和干扰素(IFNs)等，从而借助这些细胞因子在局部和(或)随血液播散至机体其他部位而发挥效应。而且，通过这些细胞因子增强机体抗感染和抗肿瘤的能力，使内毒素成为一种很有意义的免疫增强剂，尤其是 LPS 的抗肿瘤作用很早就引起人们的重视，现已应用于临床抗肿瘤治疗。

内毒素对机体免疫系统的影响是具有双重性的。一方面可以激活机体局部和整个免疫系统参与清除细菌感染；另一方面如果细菌感染严重，大量细菌在血中繁殖，使循环血中堆积大量的 LPS，并与机体各部位的单核-巨噬细胞接触，引起细胞因子的大量产生，则有可能导致感染性休克。

内毒素在作用靶细胞释放细胞因子的同时，通过这些细胞因子又可介导许多免疫学反应。因而，内毒素对机体的毒性和免疫学活性作用也是双重性的(图 2-3)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

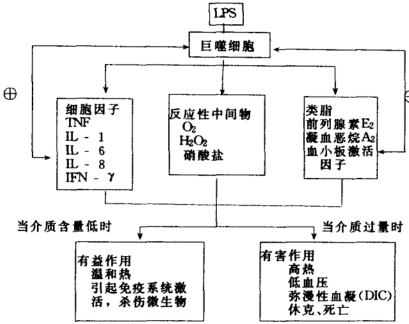


图 2-3 LPS 诱导巨噬细胞产生的三类主要介质作用示意图

鉴于内毒素的毒性作用和免疫学活性功能，各国学者都致力于研究如何降低内毒素的毒性而保留其抗感染、抗肿瘤等免疫增强活性。70 年代以后，在搞清楚 LPS，尤其是类脂 A 的分子结构与功能的关系后，开始在分子水平上有选择地对类脂 A 的化学结构中特定的基团进行改造或人工化学合成各种类脂 A 的前体或衍生物，其中最有意义的衍生物之一是单磷酸类脂 A(MPLA)。MPLA 的毒性作用很弱，具有较强的免疫增强作用，是一种高效的免疫佐剂；可激活各种免疫活性细胞，诱导产生各种免疫活性因子；激活补体系统、巨噬细胞系统和外周血粒细胞系统，增强巨噬细胞以及中性粒细胞的吞噬能力和趋化游走能力；提高宿主的抗原感染能力和抗肿瘤能力等。目前认为，MPLA 是一种有很大发展前途的生物制剂。MPLA 的局部应用效应，是否可应用于牙髓、尖周和

牙周组织疾病的防治还有待于研究。

三、LPS结合蛋白受体

LPS结合蛋白(LPS binding protein,LBP)是由肝细胞合成的一种急性期蛋白,能识别LPS的类脂A部分,并与LPS有很高的亲和性。LPS结合蛋白受体是能与LPS-LBP复合物结合并发挥功能的膜表面分化抗原之一。

因类脂A是LPS的主要生物活性部分,在LPS诱导单核-巨噬细胞分泌细胞因子的过程中,首先是由LPS与巨噬细胞表面的受体结合而使其活化。

1990年,Wright发现单核-巨噬细胞膜表面分化抗原之一的CD_{14}能与LPS-LBP复合体结合发挥受体功能。而且,他在用大肠杆菌(EC)LPS刺激人单核细胞时发现,LPS与单核细胞膜表面的结合可被抗CD_{14}抗体阻断,同时抑制单核细胞的TNF-α分泌,但这种作用必须在有血清的参与下才能发生。因此认为,LPS诱导单核细胞活化与CD_{14}以及血清中的LPS结合蛋白有关。

研究证实,单核-巨噬细胞表面存在针对LPS-LBP复合体的受体。此受体则是细胞膜蛋白家族成员之一的CD_{14}。单核细胞、巨噬细胞能表达CD_{14},而未激活的粒细胞、T细胞、B细胞则不表达CD_{14}。细胞表面分化抗原之一的CD_{14}可能作为受体参与LPS刺激单核细胞的活化过程。

CD_{14}是LPS和LPS-LBP在细胞膜表面的受体,抗CD_{14}抗体能够阻断LPS-LBP与单核细胞表面的结合,抑制细胞因子的产生,因此,CD_{14}在LPS诱导单核-巨噬细胞分泌细胞因子的过程中起着重要作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

巨噬细胞(Mocraphage, MΦ),具有多种功能,是维持机体正常的防御和生理平衡必不可少的细胞,是内毒素作用的主要靶细胞。1992 年,Okiji 报告正常大鼠牙髓中的 MΦ 按 Ia 抗原表达能力可分为两类,即 Ia^+ 和 Ia^- 的 MΦ。牙髓中 Ia 抗原表达细胞有 MΦ 样细胞和树突状细胞样细胞,而且,MΦ 在 CD_{14}表达上也存在高表达和低表达两种类型。作为 MΦ 的分化抗原之一的 CD_{14},也能对牙髓中的 MΦ 进行分类。大鼠正常牙髓中 Ia 阳性 MΦ 主要分布于冠髓中央区,数量较少,CD_{14}阳性 MΦ 相对集中于冠髓的成牙本质细胞附近和近根尖 1/3 处根髓中,表面牙髓中的 MΦ 可能来源于单核细胞,经分化成熟为不同类型的 MΦ。

四、根管病原菌内毒素的作用

由于感染根管内厌氧菌内毒素的检出,许多研究发现感染根管中的内毒素活性与牙髓、尖周病的发病和临床症状密切相关,从而使内毒素在牙髓、尖周病中的致病作用日益受到重视,使内毒素的致病基础以及在感染性疾病中的作用机理,成为牙髓病、尖周病病因学的重要研究课题。

在感染根管内的厌氧菌中,产黑色素类杆菌(Bm)和具核梭杆菌(Fn)是优势致病菌。细菌的种属不同,其内毒素结构、生物学活性和毒性也不同,如 Bm LPS 的类脂 A 中磷含量低于 Fn LPS。

荫俊给小鼠腹腔注射 Fn LPS 和 Bm LPS 后,发现经卡介苗(BCG)致敏的小鼠在注射 1.0μg LPS 时血清中即可出现肿瘤坏死因子(TNF),并随 LPS 剂量增加而逐渐升高,但 Fn LPS 的诱导活性显著高于 Bm LPS。

张郁报告在相同浓度下，Bm LPS 对细胞 DNA 含量的影响明显小于大肠杆菌(Ec)和 Fn。这些结果说明感染根管优势致病菌 LPS 不仅与 Ec 有不同之处，而且感染根管优势致病菌 LPS 之间亦有差异。

侯本祥实验研究证实：Fn、Bm、Ec LPS 在 5%人血清的参与下，能诱导体外分离培养的人外周血单核细胞产生 TNF-α、IL-6 和 IL-8 等细胞因子，3 种 LPS 对单核细胞诱导产生细胞因子的能力，依次为 Fn>Ec>Bm，所产生的细胞因子则为 IL-8>TNF-α>IL-6，三种 LPS 诱导细胞因子的产生均有明显的血清依赖性(Serum dependence)和浓度依赖性(Dose dependence)，且其诱导作用均受抗 CD_{14}抗体的影响。结果说明 Fn、Bm 的 LPS 在诱导单核细胞释放细胞因子的作用机理中与 Ec 相同，它们是依赖单核细胞膜表面受体 CD_{14}。同时抗 CD_{14}抗体在血清的协同作用下，能有效地抑制或降低 LPS 刺激单核细胞分化细胞因子。这不仅为牙髓、尖周和牙周组织感染性病变中细胞因子的来源提供了佐证，而且表明应用抗 CD_{14}抗体或减少单核-巨噬细胞 CD_{14}的表达，有可能减轻 LPS 对牙髓、尖周和牙周组织的病理损害。

关于 LPS 对牙髓细胞的直接毒性作用的研究已有报道。1983 年，Pinero 研究发现，在低浓度下内毒素对牙髓成纤维细胞的合成和基质合成具有刺激作用，促进细胞分裂和基质合成；而在高浓度下，表现出对细胞的明显毒性作用，以致引起细胞坏死。

侯本祥在证实 Fn、Bm LPS 具有诱导单核细胞产生细胞因子能力的基础上，进一步探讨了单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞的作用，结果显示，经 LPS 刺激的单核细胞培养上清

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

液在 1～3d 内对人牙髓细胞生长具有显著的促进作用，并且低浓度（1ng/ml）LPS 刺激的单核细胞培养上清液对牙髓细胞的促生长作用大于高浓度（10ng/ml）的 LPS，提示单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞的作用不仅与单核细胞产生的细胞因子有关，而且受到 LPS 自身和其他因素的影响。但是，LPS 刺激的单核细胞培养上清液对牙髓细胞碱性磷酸酶（ALP）活动性则有抑制作用，而抗 CD_{14} 抗体可阻断单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞 ALP 活性的抑制。

采用 Ec LPS（5mg/ml）涂布大鼠磨牙穿髓点 30min，出现了内毒素性牙髓炎症。早期表现为急性化脓性牙髓炎，1 周后炎症扩散至大部分冠髓，5 周时牙髓出现大部分坏死。Ia 抗原表达细胞在 LPS 作用后 3d 数量最多，以后逐渐下降，而 MΦ 则在整个过程中均有大量浸润。研究表明，MΦ 在内毒素诱发牙髓炎症中起着重要的作用。内毒素性的牙髓炎症是牙髓出现了以非特异性免疫为基础的抗原特异性免疫反应。若不及时去除抗原物质，最终仍会导致组织坏死。在内毒素性炎症牙髓组织上还有 TNF-α、IL-1-、IL-8 和 IL-6 等细胞因子的表达，它们主要位于炎症浸润区内或在其周围聚集。它们通过以下作用，即增加血管通透性，趋化中性粒细胞，增强中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附性，诱发溶酶体酶、前列腺素和其他细胞因子释放等，参与和（或）导致炎症的发生和发展。

内毒素是具有毒性和免疫学活性的致病原。当内毒素进入血液后，则可导致机体出现一系列的病理变化。通常认为，内毒素是引起 TNF 释放的启动剂，是刺激机体 TNF 升高的敏感物质。TNF 在内毒素致病中具有重要意义。为了观察内毒素血症致各组织特别是牙髓组织的病理学改变，以及抗

TNF-α 抗体对实验动物是否有保护作用，文玲英等将 28 只大耳白兔随机分为 4 组，即对照组、内毒素组、抗体保护组和无关抗体组，每组 7 只，以小剂量大肠杆菌内毒素(0.1mg/kg)分次兔耳静脉注射，复制病理性氧供依赖性模型。以 ELISA 测定血中 TNF 浓度。采用组织学、组织化学和免疫组化法评价牙髓形态学特征。结果，内毒素组与无关抗体组的牙髓组织有充血、水肿、渗出、弥漫性血管内凝血等病理变化，而对照组和抗体保护组形态正常；内毒素组血浆中 TNF 浓度则明显高于对照组($P<0.01$)，抗体保护组的 TNF 浓度则明显低于无关抗体组($P<0.01$)。说明内毒素血症可致牙髓组织的病理学改变，抗 TNF-α 抗体可以阻断其病变的发生和发展，具有临床应用前景。

第四节　异嗜性抗原和修饰的自身抗原

一、异嗜性抗原(Heterephile antigen)

某些抗原物质的抗血清，除与相应抗原发生反应外，还可与无种系关系的抗原发生反应，这种抗原称为异嗜性抗原。这类抗原是与种属特异性无关的，存在于人、动物、植物或微生物之间的可引起交叉反应的共同抗原。典型的是 Forssman 抗原。1911 年，Forssman 发现用豚鼠多种脏器免疫家兔，所得的抗体除了能与豚鼠脏器抗原发生反应外，还可在补体参与下溶解绵羊红细胞，说明豚鼠组织中含有异嗜性抗原，它可与无血缘关系的绵羊红细胞的共同抗原成分结合，出现交叉反应。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

目前发现某些病原微生物与人体组织之间也存在着一些共同抗原，它们是引起免疫病理的物质基础。如溶血性链球菌的一些多糖抗原或蛋白质抗原与人体的心肌、心瓣膜及肾小球基底膜之间的共同抗原为异嗜性抗原，当机体感染了溶血性链球菌并产生抗体后，可以与含有异嗜性抗原的机体组织结合，通过免疫反应造成组织损伤，临床表现为风湿病或肾小球肾炎。又如大肠杆菌 O_{14} 型的脂多糖与人的结肠粘膜间也有异嗜性抗原存在，此与溃疡性结肠炎的发病有关。

通过牙髓或根管感染的病原微生物也可在其他组织脏器中出现异嗜性抗原的交叉反应。例如将乙型溶血性链球菌接种于兔牙髓内，二次接种后不仅使血清抗溶血素 O 的抗体含量明显增多，皮肤出现以红斑、硬结、水肿、出血、坏死为特征的 Arthus 炎症反应，而且在心肌组织内和肾小球基底膜中出现了颗粒状、线状的荧光抗原抗体免疫复合物的沉积。说明经牙髓感染的异嗜性抗原可造成机体的致敏性病理变化。从而提示，当人体发生肾小球肾炎或心肌病变时应考虑到牙源性感染的可能性，如存在牙源性感染应立即治疗，清除病灶，防止机体其他器官的免疫性损害。

抗原为免疫原，是免疫反应的动因，不论是病原微生物或异嗜性抗原，都可通过牙髓或根管作用于局部和机体，为此，临床治疗中彻底清除来源于根管内的抗原物质，方可中止牙髓尖周组织乃至机体有关脏器的免疫病理变化。

二、修饰的自身抗原

修饰的自身抗原是正常情况下的自身组织在感染、药物、电离辐射等因素作用下，使其结构发生改变，形成新的抗原决

定簇产生的抗原。这种抗原也可引起免疫应答，造成免疫损害。

健康的牙髓对机体本身不具有抗原性，而对异体、异种来说，健康牙髓本身也有抗原性。由于牙髓所含的组织相溶性抗原比其他组织少，故牙髓的抗原性较其他组织弱。变性的牙髓则可作为抗原的一种来源，不仅可诱发尖周组织的免疫反应，还可诱发全身性的免疫应答。

1. 病变牙髓的抗原性

病变牙髓可作为抗原致敏机体。Dietz 曾将病变牙髓浸出物作为抗原进行皮内实验，发现有尖周病的患者中 40% 立即出现皮肤反应，而无尖周病变者中只有 10% 出现阳性皮肤反应。Stabholz 和 Mcarthur 以超声波处理过的坏死牙髓作为抗原，用毛细管法作末梢白细胞游走抑制试验，发现有根尖病灶的患者白细胞游走抑制率有显著增高。而感染坏死牙髓诱发免疫反应的抗原是感染根管内的细菌及其毒素。

2. 药物变更牙髓的抗原性

某些牙髓治疗的药物可变更或修饰牙髓组织，使其具有抗原性。在众多牙髓治疗药物中甲醛甲酚合剂(FC)是最有代表性的药物。Nishida(1971)曾用 8%甲醛液培育兔的自身牙髓组织致敏动物，产生了高效价的特异性抗体。Heroeg 也将未处理和甲醛处理的牙髓提取物注入兔内，发现有抗甲醛提取物的抗体。在 FC 是否使牙髓变性的研究中，Block 等进行了系列动物实验，从体液免疫反应到细胞免疫反应，均证实了 FC 是半抗原，牙髓组织可作为蛋白载体，以适当的方式与 FC 结合，最终导致牙髓组织变性而具有抗原性。同时，Shinoda (1986)进一步研究发现，FC 使牙髓变性后出现了正常牙

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

髓不具有的抗原决定簇。甲酚可能是FC中的主要半抗原成分。薛毅等采用实验免疫学方法,模拟临床应用手段进行研究,结果证实,FC是一种半抗原制剂,通过FC治疗,可与牙髓、根管内的载体蛋白结合,形成完全抗原,经根管系统致敏机体。FC合剂中甲酚是主要的半抗原成分,从而提出改良FC配方,减少甲酚含量的必要性。

然而,因动物或宿主的免疫反应具有变异性,对任何药物的免疫反应潜力,动物和动物之间不尽相同,而且,根管的牙髓组织可由于许多因素的改变而不具有抗原性,以及实验所使用药物的剂量和途径等因素的影响等,故这些研究结果有其局限性。

但是,甲醛甲酚合剂不仅对尖周组织有毒害作用,而且可能给机体和局部组织带来免疫性损害,至今,许多学者认为,从严格科学观点看,必须减少FC的毒性和刺激性,从生物学观点看,FC和多聚甲醛是不宜使用的。

主要参考文献

1. 吴敏毓,刘恭植主编. 医学免疫学. 合肥:中国科学技术大学出版社,1993
2. 李君瓔,黄惟让主编. 免疫生物学概论. 北京:北京教育出版社,1992
3. 刘正主编. 口腔微生物学. 南京:南京出版社,1995
4. 林万明主编. 医学分子微生物学进展:第1集上、下册. 北京:中国科学技术出版社,1991,1993
5. 闫玉梅,陆德源主编. 现代微生物学. 上海:上海医科大学出版社,1991
6. 雷祚荣主编. 细菌毒素分子生物学. 北京:中国科学技术出版社,1993
7. 荫俊. 口腔厌氧菌内毒素的化学分析、生物学活性对细胞因子的诱生作用及其相关致病学研究. 西安:第四军医大学博士学位论文,1992
8. 张郁. 口腔厌氧菌内毒素对人牙髓、牙周膜成纤维细胞和骨细胞的生物学效应及其相关临床研究. 西安:第四军医大学博士学位论文,1992

9. 侯本祥. 内毒素脂多糖在牙髓炎症中致病机理的实验研究. 西安：第四军医大学博士学位论文，1996
10. 文玲英，李益民. 实验性牙髓感染的致敏影响. 中华口腔医学杂志，1986,21(6):375～377
11. 薛毅，史俊南，文玲英. 甲醛甲酚合剂实验免疫学研究：甲醛甲酚合剂半抗原性质分析. 实用口腔医学杂志，1990,6(增刊):251～252, 245～247
12. 文玲英，吴兴裕，朱明光. 内毒素血症致牙髓组织病理学改变的实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志，1997,7(3):156～158
13. Wright SD, Romos RA, Tobias PS, et al. CD_{14}: a receptor for compleces of lipopoly saccharide(LPS) and binding pnotein. Science, 1990,249:1431～1433
14. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, et al. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells. Especially macrophages and Ia antigenexpressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. J Dent Res, 1992,71:1196～1202
15. Camussi G, Albano E, Tettae, et al. The molecular action of tumor necrosis factor-α. Eur J Biochem, 1991,202:32
16. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Scientific American, 1992,267(2):26～33
17. Silva AT, Cohen J. Role of interferon-γ in experimental gram-negative sepsis. J Infect Dis, 1992,166(2):331～335
18. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science, 1990,249:1439～1433
19. Pugin J, Schurer-Maly CC, Letureq D, et al. Lipopolysaccharide(LPS) activetion of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD_{14}. Proc Natl Acad Sci USA, 1993,90:2744～2748
20. Kirkland TN, Finley F, Leturcq D, et al. Analysis of lipoplysaccharide binding by CD_{14}. J Biol Chem, 1993,268:4818～4823
21. Han J, Mathison J, Ulevitch, et al. LPS binding protein, truncated at ILe-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD_{14}. J Biol Chem, 1994,268:8172～8175

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

22. Wright SD, Ramos RA, Pater M, et al. A factor in plasma that opsonizes lipopolysaecharide-bearing particles for recogniting by CD_{14} on phagocytes. J Exp Med, 1992,176:719～727

第三章　牙髓的免疫细胞

第一节　免疫细胞的名称和分类

一、免疫细胞和免疫活性细胞

免疫细胞(Immunocyte)是一类参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞。

免疫活性细胞(Immunocompetent cell，ICC)是指淋巴细胞中的T细胞和B细胞，这两群细胞均有特异性抗原受体，接受抗原刺激后能发生活化、增殖和分化，产生特异性免疫应答。免疫活性细胞也称为抗原特异性淋巴细胞。

二、免疫细胞的分类

免疫细胞中，根据其在免疫应答过程中所起的不同作用可将其分为三类：

1)**淋巴细胞**　是在免疫应答过程中起核心作用的细胞，是人体内数量较多的细胞群体之一，成人约有10^{12}个。淋巴细胞是一个不均一的复杂群体，包括许多具有不同免疫功能的亚群，T细胞和B细胞是其中最主要的两个亚群。其他淋巴细胞有NK细胞和K细胞。

2)**辅佐细胞**(Accessory cell，A cell)　是在免疫应答过程中起重要辅佐作用的细胞，它们能捕获和处理抗原，以及

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

将此抗原递呈给免疫活性细胞。单核-吞噬细胞和树突状细胞是其中的主要细胞。

3)其他免疫细胞　如各种粒细胞和肥大细胞等,多参与免疫应答的某一环节。

淋巴细胞和单核-吞噬细胞是免疫活动中最直接相关的两类细胞。

第二节　T细胞和B细胞

一、T细胞和B细胞的来源

T细胞和B细胞均由骨髓中的多能干细胞分化成淋巴细胞后,再进一步分化而来。

淋巴干细胞可在骨髓中分化为前T细胞和前B细胞。

前T细胞进入胸腺分化发育为成熟的T细胞,故称胸腺依赖性淋巴细胞(Thymus dependent lymphocyte),简称T淋巴细胞(T lymphocyte)或T细胞。T细胞接受抗原刺激后活化、增殖和分化成效应T细胞,担负细胞免疫功能。

前B细胞在哺乳类动物的骨髓或鸟类的腔上囊分化发育成熟,故称骨髓依赖性淋巴细胞(Bone marrow dependent lymphocyte)或囊依赖性淋巴细胞(Burse dependent lymphocyte),均简称为B淋巴细胞或B细胞。B细胞接受抗原刺激后活化,增殖和分化为浆细胞,然后由浆细胞产生特异性抗体,发挥体液免疫功能。

二、T细胞和B细胞的区别

T、B细胞在光镜下均为小淋巴细胞,形态上难以区别。

在扫描电镜下观察，多数 T 细胞表面光滑，绒毛突起较少；而 B 细胞表面较为粗糙，有较多绒毛状突起。但这一区别不能作为 T、B 细胞的特征标志和进一步鉴定其不同亚群。

淋巴细胞的表面标志是细胞表面存在着的大量不同种类的蛋白质分子，这些细胞表面分子在 T、B 细胞及其亚群之间并不完全相同，可依据它们鉴定 T、B 细胞及其亚群。这些标志通常分为表面受体和表面抗原两大类。

表面受体是指淋巴细胞表面能与相应配体发生特异性结合的分子结构。T 细胞和 B 细胞均有各自独特的特异性抗原受体，能与相应的抗原发生结合。

表面抗原是指淋巴细胞表面存在的能被特异性抗体（如单克隆抗体）所识别的表面分子。通常这些表面抗原的表达与淋巴细胞分化过程有关，故又称为分化抗原。

表面受体和表面抗原两者之间并无严格界限，它们实际上都是细胞表面的膜表面分子。淋巴细胞表面的抗原和受体不仅是鉴定和区别淋巴细胞亚群的表面标志，而且是参与免疫应答过程中细胞相互接触导致激活的重要表面分子。

T 细胞表面有多种膜表面分子，这是 T 细胞识别抗原、与其他免疫细胞相互作用、接受信号刺激等的物质基础，也是鉴别和分离 T、B 细胞亚群的重要依据。

三、T 细胞亚群

T 细胞是多功能不均一的细胞群。70 年代以来，随着抗人 T 细胞单克隆抗体研制成功，T 细胞亚群的基础研究得以广泛开展。至今，虽然存在许多功能和分化抗原方面均不相同的亚群，但有关 T 细胞亚群划分的原则和命名尚未统一。目

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

前习惯上先按分化抗原分成两大亚群，而后再根据功能进一步划分。

1. 根据 CD 抗原或分化群(Cluster of differentiation, CD)划分

根据 CD 抗原或分化群，可将成熟 T 细胞分成 CD_4^+ 的 T 细胞和 CD_8^+ 的 T 细胞。CD_4 是 CD_2^+、CD_3^+、CD_4^+、CD_8^- 的 T 细胞，具有辅助性 T 细胞功能；CD_8 是 CD_2^+、CD_3^+、CD_4^-、CD_8^+ 的 T 细胞，具有抑制性 T 细胞和杀伤性或细胞毒性 T 细胞的效应。CD_4 和 CD_8 抗原分别出现在不同功能亚群的 T 细胞表面，在同一 T 细胞表面只表达其中一种。

所有 T 细胞表面均具有识别和结合特异性抗原的分子结构——T 细胞抗原受体(T cell antigen receptor, TCR)，TCR 不能识别和结合单独存在的抗原片段或决定簇。只有当抗原片段或决定簇与抗原递呈细胞上的主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC)分子结合在一起时，T 细胞的 TCR 才能识别或结合 Ⅱ 类分子(或 Ⅰ 类分子)-抗原片段复合物中的抗原部分。TCR 识别抗原须受 MHC 分子与抗原片段结合的制约。MHC 是指某一物种的某一号染色体上一组密切连锁的基因，它在主要组织相容性抗原识别以及清除外来和内在抗原中起重要作用。人的 MHC 称为 HLA，小鼠的称为 H-2。MHC 编码的抗原为一类同种异体抗原(Alloantigen)。其中 Ⅰ、Ⅱ 类抗原主要以细胞膜镶嵌蛋白的形式存在，也可脱落成为可溶性形式。它们又称为 Ⅰ、Ⅱ 类分子。

CD_4 和 CD_8 抗原可分别与 MHC 的 Ⅱ 类分子和 Ⅰ 类分子结合，以促进 TCR 与抗原-MHC 分子复合物结合。CD_4 和

CD_8 又分别称为 MHC Ⅱ 类分子受体和Ⅰ类分子受体。

2. 根据功能划分 CD_4^+ T 细胞的亚群

1)辅助性 T 细胞(Helper T cell, T_H) 可协助 B 淋巴细胞产生抗体,也能协助其他 T 细胞分化成熟。

2)诱导性 T 细胞(Inducer T cell, T_I) 能诱导 T_H 和 T_S 细胞成熟。在免疫应答的效应阶段和Ⅳ型超敏反应中能释放多种淋巴因子,导致炎症反应发挥排除抗原的作用。

3. 根据功能划分 CD_8^+ T 细胞的亚群

1)抑制性 T 细胞(Suppressor T cell, T_S) 能抑制 B 细胞产生抗体和抑制其他 T 细胞分化增殖。

2)细胞毒性或杀伤性 T 细胞(Cytotoxic T cell, T_C; Killer T cell, T_K) 在免疫效应阶段,T_C 识别带有抗原的靶细胞,随后发生细胞接触,接触后再释放穿孔素(Perforin)和通过其他机理使靶细胞溶解。

上述五个 T 细胞的亚群中,T_H、T_I 和 T_S 相互协调和制约,对免疫应答起调节作用,称为调节性 T 细胞;Tc 和 T_D 在免疫应答的效应阶段发挥作用,称为效应性 T 细胞。

四、B 细胞亚群

1. B 细胞的表面标志

1)B 细胞抗原受体 是存在于 B 细胞表面的膜免疫球蛋白(Surface membrane immunoglobulin, SmIg 或 mIg),能识别和结合特异性抗原的受体。SmIg 均为单体结构,在正常人外周血中多数 B 细胞同时携带 SmIgM 和 SmIgD,少数 B 细胞仅携带 SmIgG,SmIgA 或 SmIgE。SmIg 是鉴别 B 细胞的主要特征,常用荧光素标记的抗 Ig 抗体作荧光抗体染色法

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

来检测B细胞。

2)Fc 受体(Fc receptor，FcR) B细胞表面存在与IgFc段结合的受体。

3)补体受体(Complement receptor，CR) 大多数B细胞表面存在能与C_{3b}和C_{3d}发生特异性结合的受体，分别称为CR_{I}和CR_{I}。CR与抗原-抗体-补体复合物结合后也可辅助B细胞捕获与Ig结合的抗原。B细胞表面的CR可用EAC花结方法测出。

4)丝裂原受体 B细胞表面的丝裂原受体与T细胞不同。

5)其他表面受体 B细胞除有一些与T细胞共有的CD抗原，如CD_5外，还有一些B细胞所特有的CD抗原，如CD_9、CD_{10}、CD_{19}和CD_{20}。

2. B细胞亚群的划分

目前仍将B细胞分为两个亚群：B_1细胞和B_2细胞。B_1细胞为T细胞非依赖性细胞，接受T_i抗原刺激后活化增殖，不需T细胞辅助，细胞表面仅有SmIgM。B_2细胞为T细胞依赖性细胞，与T_D抗原结合而发生免疫应答，需T细胞辅助，细胞表面同时有SmIgM和SmIgD。

五、牙髓中的T、B细胞和T细胞亚群

牙髓作为机体的一部分，自然遵循免疫的普遍规律，然而因其解剖和组织结构的特性不同也表现出一定的个性。

1987年，Jontell研究证实，正常牙髓中具有与免疫防御系统有关的各种细胞，主要是T细胞系，多数分布在牙髓基质中，而且意外发现CD_4/CD_8(T_H/T_S)阳性细胞的比值与外

周血相反，平均为1∶1.6～1∶3.1，正常外周血CD_4/CD_8的比值约大于1.7。

1988年，蜂元等人用同样的研究方法证实了上述结果，并且发现在炎症牙髓中两者的比值逆转，即CD_4较CD_8多。

随后，1989年，Hahn等对人牙髓中T、B细胞做了详细的定量研究，结果表明，正常牙髓中CD_4/CD_8为0.26，可逆性牙髓炎为0.56，不可逆性牙髓炎是1.14。还首先在正常牙髓中检测出B细胞，否定了曾认为正常牙髓中缺乏B细胞的观点。

但是，1991年，Mangkornkarn等采用流式细胞分类术对正常牙髓的T、B细胞进行定量分析，其结果与先前的研究明显不同，牙髓细胞中T细胞为1%，$CD_4/CD_8=1/2.1$，未发现B细胞，认为这种差别可能是流式细胞术能全面、精确地对细胞进行计数。

由于免疫细胞化学能在原位确定组织及细胞结构的化学成分或化学性质，因此这种敏感的检测技术已成为当今牙髓中免疫成分研究的主要手段。

1993年，吴海珍采用免疫细胞化学对正常和炎症人牙髓中的免疫细胞进行了研究，结果表明，正常牙髓中央区有散在分布的T细胞和T细胞亚群，T细胞亚群的阳性着色部位在胞膜上，CD_4/CD_8的比值为0.55。由于T细胞在正常牙髓中只是一种常备防御细胞，只有抗原侵入时才触发一系列变化和产生免疫效应，CD_8占优势的现象在全身组织中较为特殊，说明这类免疫活性细胞是在牙髓抵御外界抗原的侵袭中起到提供免疫应答物质基础的作用，其意义可能在于牙髓的免疫保护和免疫监视。正常牙髓中未发现B细胞，提示正常状态

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

下不存在体液免疫应答。

炎症牙髓中T细胞明显增加，并以CD_4增加最显著，使CD_4与CD_8的比值明显增高，平均为1.15，与正常牙髓中的比值相反。CD_4主要是T_H亚群，而被激活的T_H又能释放出多种淋巴因子，这些因子是细胞免疫的主要介质，多数以非特异方式作用于细胞，表达多种功能。例如，作用于巨噬细胞的因子可以使该细胞大量聚集、激活，并不断吸引血液中的单核细胞和粒细胞移动到局部，构成炎症反应或超敏反应；作用于B细胞的分化因子，能促进B细胞的发展、分化，形成浆细胞，产生免疫球蛋白。已经证明，所有发展为产生IgG、IgA和IgE的B细胞均需要T_H在活化过程中的作用。与此同时，T_S受到T_H产生的有关因子作用后，而产生抑制因子，调节B细胞的免疫应答。因此，炎症牙髓中CD_4明显增加，表明在牙髓炎的免疫应答、炎症性超敏反应和免疫过程中，T_H起着主导作用。

炎症牙髓中有B细胞，且慢性牙髓炎急性发作的组织中的B细胞数量较慢性炎症组织中多，这种现象可能是因为抗原的突然大量入侵或机体免疫应答调节功能的改变，导致B细胞的分化增殖，以及记忆性B细胞向局部聚集，增强了体液性免疫应答。

炎症牙髓中T细胞与B细胞平均比值为2.31，B细胞的阳性着色在胞膜和胞浆中。

由B细胞在接受抗原刺激之后，活化、增殖和分化成浆细胞，可产生特异性抗体，发挥体液免疫功能。产生抗体的浆细胞是含免疫球蛋白细胞，称为抗体产生细胞。研究证实，正常牙髓缺乏抗体产生细胞，炎症牙髓中有明显增多的抗体产

生细胞，IgG、IgA、IgM 细胞之间的比例均为 23∶7∶1，说明炎症牙髓中存在体液免疫反应。抗体的产生可以保护牙髓，但若牙髓受到抗原的过量刺激，相继形成大量免疫复合物不能完全被吞噬或清除，则可使局部组织出现血管变化、炎细胞浸润和组织损伤为特征的 Arthus 反应，引起牙髓的严重损害。B 细胞也具有抗原递呈能力，能递呈某些抗原决定簇给 T 细胞引起免疫反应，因此，免疫反应可作为牙髓防御的机制和组织损害的介导。

第三节　单核吞噬细胞和树突状细胞

在免疫应答过程中，除 T 细胞和 B 细胞起核心作用外，尚需一些免疫细胞包括单核吞噬细胞和树突状细胞协助参加，这些细胞为辅佐细胞，简称 A 细胞。因 A 细胞在免疫应答中的主要作用之一是递呈抗原，故又称为抗原递呈细胞(Antigen presenting cell，APC)或 Ia 抗原表达细胞。抗原递呈细胞可以吸收和处理复杂的抗原并以适当的形式将抗原递呈给淋巴细胞。即当机体受到外来抗原侵袭时，APC 上的 Ia 抗原与外来抗原形成复合物，并递呈给辅助 T 淋巴细胞(T_H)，只有具有此种复合物受体，能同时识别外来抗原和 Ia 抗原的 T 细胞才能活化，从而启动体内的免疫应答。Ia 抗原递呈细胞有巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞、活化的 T 细胞、中性粒细胞和郎罕细胞等，其中最主要的是单核吞噬细胞和树突状细胞。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

一、单核吞噬细胞

单核吞噬细胞系统(Mononuclear phagocyte system)是血液中的单核细胞(Monocyto)和组织中的巨噬细胞(Mocraphage,MΦ)的统称。单核细胞在骨髓分化成熟进入血液,在血液中停留数小时至数日后,通过毛细血管进入组织中,分布在全身多种器官和结缔组织中分化成熟为巨噬细胞。巨噬细胞在正常组织中一般是静止的,在结缔组织中又被称为组织细胞。

1. 单核吞噬细胞的表面受体

单核吞噬细胞表面有多种受体。与免疫有关的重要受体有C_{3b}受体,以及某些淋巴因子受体。MΦ 表面有较多的主要组织相容性复合体(MHC)Ⅰ类和Ⅱ类分子,与抗原递呈有关。它具有多种功能,是维持机体正常防御和生理平衡必不可少的细胞。

2. 单核吞噬细胞的免疫学功能

单核吞噬细胞具有多种免疫学功能,既参与非特异性免疫应答,也参与特异性免疫应答。主要功能有:

1)吞噬和杀伤作用　组织中的巨噬细胞可吞噬和杀灭多种病原微生物和处理衰老损伤的细胞,是机体非特异性免疫的重要因素,与抗体(IgG)和补体(C_{3b})结合的细菌等抗原物质,更易被 MΦ 吞噬,这就是抗体和补体的调理作用。MΦ 还可通过 Fc 受体与结合有 IgG 抗体的靶细胞发生结合,发挥 ADCC 作用,杀伤靶细胞。淋巴因子可激活 MΦ,使其更有效地杀伤细胞内寄生菌和杀伤肿瘤细胞。

2)抗原递呈作用　在免疫应答中,MΦ 可摄取、处理抗

原，并将有效抗原成分递呈给淋巴细胞。

MΦ 处理抗原的过程中尚不十分清楚，目前认为经适当降解的抗原与 M Φ 主要组织相容性复合体(MHC)的 Ⅱ 类抗原，即小鼠 Ia 抗原或 HLA-DR 抗原在 MΦ 表面形成 MHC-抗原复合物，再向具有此种复合体受体的 T 细胞递呈。MΦ 是重要的抗原递呈细胞(APC)。

3)合成和分泌作用　MΦ 为高度的分泌细胞，已知 MΦ 能合成和分泌的生物活性物质至少有 50 种以上，通过分泌各种生物活性的物质参与免疫应答，炎症过程和组织修复。有人将 MΦ 分泌的生物活性物质称为单核因子(Monakine)，而能调节淋巴细胞活性的物质称为淋巴细胞活性因子(Iymphocyte activating factor, LAF)。淋巴因子或抗原抗体复合物激活的 MΦ 还通过产生蛋白分解酶，生成活性氧，释放花生四烯酸代谢产物而引起组织损伤和参与炎症反应。

4)抑制作用　即当 MΦ 过多存在时，抑制性 MΦ(Supressor macrophage, SMΦ)对免疫反应起抑制作用，它能抑制抗体的产生、淋巴细胞母细胞化、淋巴细胞混合培养反应、细胞杀伤反应等，具体机制尚不明确。

MΦ 的这些功能并不是所有的 MΦ 都具有的，不仅不同组织中 MΦ 功能不一样，即使是同种组织中的 MΦ 也不相同。因此，MΦ 在功能上为一个非均一性的集团。

MΦ 必须先被活化然后才行使其功能。它在体内活化的因素有：T 细胞活化产物，免疫复合物，补体活化裂解的产物 C_{3b} 等。

MΦ 有多种功能，主要可归结为两个方面，一是递呈抗原作用，摄取、处理和传递抗原给淋巴细胞；另一类释放细胞因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

子，促使接受抗原的淋巴细胞活化和增殖，即递呈抗原和通过细胞因子激活淋巴细胞。

二、树突状细胞

树突状细胞(Dendritic cell，DC)简称 D 细胞，来源于骨髓，由髓样干细胞分化而来，随血流进入组织分布在各处的淋巴器官和组织中。D 细胞的特点是细胞表面伸出许多树突状突起，胞内线粒体丰富，高尔基体发达，但无溶酶体及吞噬体，故 D 细胞无吞噬能力。大多数 D 细胞有较多的 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子，这与 D 细胞有较强的抗原递呈能力有关。少数 D 细胞表面有 Fc 受体和 C_{3b}受体，可通过结合抗原-抗体复合物将抗原递呈给淋巴细胞。

巨噬细胞与树突状细胞处理抗原的能力有所不同，前者的吞噬能力较强，抗原递呈能力较弱；后者是递呈抗原的主要细胞，而很少或没有吞噬能力，也许树突状细胞与巨噬细胞分别递呈不同的抗原。

三、牙髓中的 Ia 抗原表达细胞

单核吞噬细胞和树突状细胞同属于 Ia 抗原递呈细胞或 Ia 抗原表达细胞。Ia 抗原表达细胞不仅分布在机体免疫系统组织内，而且也广泛存在于全身非免疫系统组织中。实验研究证实，正常人、大鼠牙髓中有一定量的 Ia 抗原表达细胞。

Jontell(1987)将牙髓中的 Ia 阳性细胞按形态分为两类：一类为位于成牙本质细胞层，呈树突状的树突状细胞样细胞；另一类为分布在牙髓中央结缔组织内，体积较大，呈圆形或椭圆形的 MΦ 样细胞。

Okiji(1992)采用Ia抗体和MΦ特异性抗体双重染色，对牙髓中的Ia抗原阳性细胞进行分类，结果认为Ia抗原阳性细胞由Ia抗原阳性渗出性MΦ，树突状细胞和Ia抗原阳性的常驻性MΦ组成。大鼠牙髓中的MΦ按Ia抗原表达能力可分为两类，即Ia^+和Ia^-的MΦ。

吴海珍(1992)研究表明，正常人年轻恒牙牙髓中有较多的Ia阳性细胞，主要位于成牙本质细胞层和血管周围。在龋源性炎症牙髓中Ia阳性细胞明显增多。同时发现，Ia抗原的表达部位多在细胞膜上，少数位于胞浆内。阳性细胞形态多数为有细胞突起的不规则形、椭圆形、圆形和条索状。炎症牙髓中的阳性细胞则以椭圆形为主，部分细胞呈典型的树突状。

Bergenholtz(1991)用LPS、ConA分别封入大鼠切牙牙髓、激发牙髓炎症，结果也出现了Ia阳性细胞不断增多的现象。认为Ia阳性细胞在损害组织中的出现与释放与抗原物质有关。

侯本祥(1996)用5mg/ml的大肠杆菌内毒素溶液涂布大鼠磨牙穿髓点30min，建立了内毒素性牙髓炎模型，在建立实验性牙髓炎的基础上，利用标记单核细胞、MΦ、树突状细胞、组织细胞和Ia抗原细胞等多种单克隆抗体，通过免疫组化手段，观察内毒素刺激的炎症牙髓中MΦ、Ia抗原表达细胞的动态变化。结果，LPS刺激牙髓后1d，MΦ、Ia抗原表达细胞向穿髓点下方移行、浸润，组织细胞体积增大。3d时这些细胞向炎症区聚集，数量明显增加。说明，在LPS入侵早期，组织细胞较早感知抗原刺激，将牙髓的防御机能从静止状态活化，调动Ia抗原表达细胞和来自血中的MΦ向炎症区移行，共同参与清除外来抗原的防御反应。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

许多研究都是根据形态学表现将牙髓中 Ia 抗原阳性细胞分为 MΦ 和 DC。有人指出，部分单核、巨噬细胞也表现为树突状形态，而且在用单核、巨噬细胞单抗的研究中也发现有相当数量的巨噬细胞呈树突状外观，因此不能肯定树突状的阳性细胞都是树突状细胞。目前认为牙髓中的 Ia 抗原表达细胞有两种，一种是 MΦ 样细胞，另一种为树突状细胞样细胞。

Ia 抗原表达细胞作为抗原递呈细胞，具有在 T 细胞认识非己抗原的过程中，将抗原物质进行适当修饰后递呈给 T 细胞受体的功能。T 细胞必须同时识别递呈的抗原及递呈细胞表面的 Ia 抗原方能活化。上述实验，在 LPS 刺激后 3d，Ia 抗原表达细胞即增加并达到高峰，聚集在炎症区周围。提示这些细胞可能具有向 T 细胞递呈抗原的能力，它们将外来抗原递呈给特异性 T 淋巴细胞，启动细胞免疫应答，开展抗原特异性防御反应。

可以认为，正常牙髓中的 Ia 阳性细胞是一种常备的免疫防御细胞，起清除和免疫监视作用，当外界物质侵入牙髓后，这些细胞群便对抗原物质进行处理和加工，并将抗原决定簇递呈给特异性 T 细胞启动免疫反应，发挥免疫应答和炎症反应的多重效应。

第四节　其他免疫细胞

在免疫细胞中的其他细胞主要是肥大细胞、各种粒细胞和血管内皮细胞，它们在免疫应答中某些环节的作用也是不可忽视的。

一、肥大细胞

肥大细胞(Mast cell，MC)是1877年Erlich首先命名和描述的细胞，它存在于机体许多器官中，是疏松结缔组织中的一种细胞成分，为圆形、椭圆形、胞质充满紫红色颗粒的细胞。当机体受到刺激时，或肥大细胞受到损伤及激发后，肥大细胞可大量增加并脱颗粒和释放组织胺、慢反应物、肝素和5-羟色胺，以及前列腺素、激肽、细胞因子等，从而参与机体广泛生理功能和免疫反应。

近年来，随着分子生物学的研究进展，对肥大细胞的分子生物学及其生物学效应获得了许多资料。

肥大细胞不仅在速发型变态反应中起重要作用，而且参与迟发型反应(Latephasereactions，LPRs)。近年研究发现，MC还具有多种细胞因子的特性，并通过肥大细胞和白细胞分泌的细胞因子级联反应(Cascade)介入机体的多种生理、病理过程。

1. 肥大细胞的分子生物学

MC的分子生物学研究取得了很大进展，一是发现了新的表面受体，并从分子水平上对MC表面受体介导效应有了进一步认识；二是克隆了多种肥大细胞蛋白酶(Mast cell protease，MCP)的基因。

现已发现MC的表面结构由细胞粘附分子和表面受体组成。肥大细胞含有4种糜蛋白酶、2种类胰蛋白酶、1种肽链端解酶即羧肽酶A。

2. 肥大细胞的生物学效应

MC通过释放脂源性介质、分泌颗粒介质和细胞因子等

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

发挥其影响机体内多种生物反应过程的作用，包括：①淋巴细胞反应，如粘附、趋化、IgE 生成、MC 增殖和嗜酸粒细胞激活；②纤维母细胞反应，如增殖、空泡形成和胶原生成；③酶底物反应，如Ⅳ型胶原和脂蛋白等的降解，凝血反应系统的激活；④微血管反应，如微静脉通透性增加、淋巴细胞粘附及微血管收缩或扩张。

MC 是多种细胞因子的产生细胞，产生的细胞因子有 IL-1～IL-6、GM-CSF、IFN-γ、TNF-α、TNF-β 等。

调节 MC 产生细胞因子的途径有两种：一是免疫激活途径，二是 TPA 样物质刺激途径。前一种途径除快速诱导炎症因子的合成来发挥 MC 对血管内皮细胞、淋巴细胞和凝血系统的效应外，还导致多种免疫调节因子或造血生长因子的释放，而后一种途径则可能偏向诱导 MC 释放炎症介质。

近年研究还发现，TNF-α 代表着 MC 的一种新介质类型，与目前已知的 MC 介质如组织胺类或脂源性介质不同，TNF-α 的分泌既有来自胞内预先合成的，亦有经刺激后新合成的。但是，目前对 MC 分泌的 TNF-α 和 MΦ 分泌的 TNF-α 是否为同一物质尚未确定。

迟发型反应(LDRs)是引起组织损伤、哮喘病和 IgE 依赖性慢性炎症反应的主要原因，其发生机制与 MC 及其释放的介质密切相关。有实验研究发现，LPRs 的发生具有 MC 依赖性，并且在 MC- 重建基因座有 TNF-α、mRNA 的高表达和大量的中性粒细胞浸润；当以抗 TNF-α 抗体进行阻断时则出现细胞肿胀减轻，中性粒细胞浸润减少 50%的现象。提示通过干扰或阻断 MC 产生细胞因子的途径对治疗 LPRs 可能有一定临床意义。

3. 人牙髓组织中的肥大细胞

关于人正常牙髓组织中是否存在肥大细胞尚有争论。

Wislocki 等研究了鼠、猴、人牙髓组织，仅在猴牙髓组织中某个时期发现“可靠的肥大细胞”。而且，他们在研究不同哺乳动物的组织时发现牙龈组织中有大量肥大细胞，而牙髓组织则完全缺乏。

Annerath 等在研究 18 例人牙髓和牙龈时也得出同样的结论。

Dochrill 在人活检和尸检材料研究中发现除肿胀的牙髓含有肥大细胞外，正常牙髓组织中缺乏肥大细胞。因而过去人们认为，牙髓组织仅是机体缺乏肥大细胞的结缔组织。

1989 年，文玲英观察了 10 例正常牙髓组织，发现有少数散在的肥大细胞，每例牙髓标本的 MC 约有 2～3 个，表明正常牙髓组织中的肥大细胞数少而不是没有。鉴于牙髓组织的特殊环境和增龄变化，人牙髓肥大细胞的存在可能与牙髓组织的某个时期有关。

目前已知，肥大细胞并非起源于未分化间充质细胞，而起源于造血干细胞。它也有它的细胞亚群。

Miller 认为大鼠的肥大细胞系至少有两个亚群：结缔组织肥大细胞和肠粘膜肥大细胞。它们之间有许多相同特征，但各有其特点。

Berrett 报道，不同动物，不同组织中肥大细胞有功能异质性(Heterogeneity)，推测牙髓中的 MC 可能是肥大细胞系中的某个亚群，它与其他结缔组织和肠粘膜中的 MC 不完全相同，也有它特有的“功能异质性”。

炎症牙髓组织中，肥大细胞数增多，平均每例标本的 MC

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

数约为 5～7 个，多分布于小血管的周围。虽然正常和炎症牙髓中肥大细胞的作用和功能至今仍不清楚，然而，肥大细胞的生物学效应在正常和炎症牙髓中同样具有重要意义。

二、中性粒细胞和嗜酸粒细胞

1. 中性粒细胞

由于中性粒细胞有活泼的吞噬功能，主要作为效应细胞，在非特异性抗原感染免疫中，以及抗体介导的超敏反应中起重要作用。

中性粒细胞之所以与免疫系统有着重要的联系，首先是因为它们有趋化性。由活化的淋巴细胞所释放的中性粒细胞趋化因子(NCF)，能引导中性粒细胞到免疫反应的部位。其次，中性粒细胞也具有 C_{3b}及抗体 Fc 段的膜受体，能与抗原-抗体复合物上游离出的 FC 部分结合从而形成了中性粒细胞-抗体-抗原复合物，增强了对抗原的吞噬作用，而且，活化的中性粒细胞还可通过释放的多种细胞因子参与免疫应答。

2. 嗜酸性粒细胞

嗜酸粒细胞也具有吞噬作用，对抗原-抗体复合物有显著的嗜性。有人曾提到嗜酸性粒细胞很可能就是活化并吞噬了抗原-抗体复合物的一种细胞，它也同样具有递呈抗原的作用。嗜酸粒细胞是人类白细胞中唯一能杀死或杀伤寄生虫的细胞。

三、血管内皮细胞

内皮细胞(Endothelial cell，EC)是位于血管内膜表面的细胞。以往认为，EC 具有覆盖血管内腔和隔离血液与机体内

环境的屏障作用。近期的研究表明，内皮细胞层是一个代谢活跃的组织，是体内最大的代谢与内分泌器官。因EC处于血管内膜表面，与血液循环中的免疫细胞有广泛的接触机会，外界微生物进入机体时可能首先经过EC作用，然后在局部或全身发生免疫反应，因此可以说，大量的血管内膜是一个很大的免疫反应场所。

人体内大约有 10^{12} 个血管内皮细胞，总重量1000～1500g，与肝脏重量相当，面积约 $1000m^2$，是自身体表面积的500～700倍。目前EC已成为医学生物学领域中重要的研究对象。

EC是体内极其重要和活跃的炎症细胞，它在炎症反应中的作用有：

1. 调节血管通透性

EC间的紧密连结能有效地防止血管中各种血液成分的漏出。60年代末，Majno首先注意到组胺类炎症介质引起的血管壁通透性增高主要不是由于EC受损伤，而是EC收缩，细胞连接间隙增大所致。提示，EC是通过收缩而影响细胞连接和血管壁通透性的。在体的血管内皮细胞为扁平状，衬覆于血管内表面；离体培养的EC为单层致密连接的上皮样细胞，细胞间连接紧密，没有重叠、伪足和突起。多种炎症介质，如血小板激活因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1)、γ-干扰素(IFN-γ)等都能不同程度地刺激EC，使细胞变长，呈纤维母细胞样，并伸出树枝状细胞突起，紧密接触的细胞连接出现裂隙。Montesano(1985)报道，IFN-γ和IL-1联合应用处理EC，可使细胞极度伸长，呈现游走细胞的特征。Stolphen(1986)报道，用IFN-γ和TNF处理EC也出现类似

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

的效果。表明一些细胞因子可通过协同作用引起EC形态变化。在体微血管EC受刺激后胞体回缩，细胞间隙增大，这可能是炎性介质和免疫活性因子引起血管通透性增高的重要机制之一。实验证明，狒狒皮内注射人重组TNF，可导致血管通透性增强，局部组织水肿和大量炎细胞浸润。根据这个原理，临床上可以通过阻断炎症介质对EC的作用防止细胞回缩，达到拮抗血管通透性增高的目的。

EC形态变化的机制尚不完全清楚，可能主要与细胞骨架成分的分布状态、功能变化以及细胞外基质丢失有关。实验表明，EC与TNF接触后，出现细胞骨架改变和细胞内沟形成，同时EC层下呈致密网状排列的纤维粘连蛋白丢失，呈现“虫蚀状”斑片。纤维粘连蛋白的变化和细胞骨架的改变同细胞形态的变化相平行。

2. 调节血液凝固功能

EC能产生很多与凝血、抗凝血有关的物质。正常分泌的PGI_2、硫酸肝素样物质、血栓调节蛋白和溶酶原激活物等可产生很强的抗凝作用。相反，PAF、纤溶酶原酶激活物的抑制则可促进凝血过程。生理情况下，EC表面的凝血-抗凝血平衡稍偏向抗凝血一侧。当EC受到损伤或受到TNF、IL-1等刺激后，EC分泌的与凝血有关的因子明显增多，使正常的抗凝特性迅速转为促凝特性，血管内易发生凝血。体内实验表明，给兔血管内注射IL-1，凝血机制活化和纤维粘连蛋白沉积。这种反应本是机体的保护措施，有利于止血，若反应过度，便会促进微循环障碍和炎症等病理过程。

3. 调节血管舒缩功能

EC对局部和全身的血管张力都有很重要的调节作用。

EC释放的血管舒张因子有PGI_2、内皮细胞源血管舒张因子(EDRF)。PGI_2有抑制血小板聚集、扩张血管、促进纤溶、保护细胞等作用,还可以影响细胞的通透性和收缩性。EDRF为EC受乙酰胆碱、缓激肽、组胺、5-羟色胺刺激后产生,主要作用有舒张下层平滑肌及抑制血小板聚集和粘附。抑制EDRF作用的物质有美蓝、血蛋白、肌红蛋白和过氧化物阴离子还原剂。内皮层的炎性细胞可以灭活已释放出的EDRF。

EC产生的血管收缩因子主要有TXA_2、血管紧张素-Ⅱ、氧自由基和内皮素(ET),其中ET是迄今所知的最强的缩血管物质。给大鼠静脉注射ET-1可引起升压反应,缺氧、凝血酶、肾上腺素等可刺激EC迅速合成ET。EC产生的血管舒张因子与收缩因子的比率决定血管的舒缩状态,调节血液的力学和器官血流量。

4. EC与白细胞的相互作用

EC与白细胞粘附是白细胞趋化、游走和吞噬活动的基础。在炎症反应开始时即可出现白细胞与EC的粘附,表明它们的粘附在炎症过程中的主要作用。EC对白细胞的粘附是白细胞游走到组织间隙发挥作用的前提,它们的粘附主要与粘附分子有关。参与粘附的蛋白主要有三类:① 整合素家族(Integrins),有β_1、β_2、β_3三个亚族,其中β_1(Verylete antigen,VLA)和β_2(Leukocyte-cell adhesion molecule, Leu-CAM)参与白细胞及白细胞与EC的粘附。②免疫球蛋白家族,有9种粘附蛋白,其中细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和细胞间粘附分子-2(ICAM-2)及血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)与白细胞-EC粘附有关。③选择素家族(Selectin),包括白细胞粘附分子-1(LAM-1),内皮细胞-白细胞粘附分子-1(ELAM-1)和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

GMP-140，均与白细胞-EC 粘附有关。

已经证实，EC 表达多种粘附分子，主要有：

ICAM-1 是白细胞表面粘附分子 CD_{11}/CD_{18}系统的配体，分子量 84 000～95 000，参与淋巴细胞、单核细胞、多形核白细胞与 EC 的粘附。IL-1、TNF 能显著增加 EC 表面 ICAM-1 的表达，24 小时达高峰，如果炎症介质持续存在，ICAM-1 表达持续增加。ICAM-1 可能与慢性炎症过程密切相关。

VCAM-1 分子量为 110 000，介导淋巴细胞、单核细胞粘附于 EC。IL-1、TNF、LPS 可迅速诱导 EC 表达 VCAM-1，促进淋巴细胞游出血管和聚集在组织内。

ELAM-1 分子量 115 000，可促进中性粒细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞、淋巴细胞、单核细胞粘附于 EC。IL-1、IFN 可诱导 ELAM-1 表达，4～6 小时达高峰，24 小时下降。在炎症反应早期引起白细胞贴壁。TNF-γ 不能诱导 ELAM-1 表达，但能增强并延长 ELAM-1 表达。IFN-γ 只能使 EC 与 T 细胞粘附增强，而不能增强与其他白细胞的粘附。

GMP-140 又称 P-选择素。最近发现，白细胞只有与 GMP-140 作用并发生滚动，流速减慢的情况下，才能粘附于 EC。说明 GMP-140 在白细胞-EC 粘附的起始阶段极为重要。

EC 通过表达各种粘附分子促使白细胞与其粘附，这样就决定了白细胞聚集在局部炎症的病灶内。

5. 分泌炎症介质、生成细胞保护剂

EC 不仅是细胞因子作用的靶细胞，而且它还可以分泌多种介质调节炎症细胞的功能。EC 可表达和分泌集落刺激因子(CSFs)；IL-1、TNF 可以诱导 EC 对 CSFs 基因的转录；病毒可诱导 EC 生成 IFN-α、β；TNF、IFN-γ 多种因子可诱导

EC 表达和分泌 IL-1;EC 可合成大量 IL-6,而 IL-1、TNF 等可增强 EC 对 IL-6 的生成;PAF 是一种效应很强的脂类炎症介质,EC 是体内 PAF 的重要来源,EC 受 IL-1、TNF 刺激可合成大量 PAF。同时 PAF 通过自分泌和旁分泌作用使 EC 产生更多的炎症介质,如 IL-1、IL-2、IL-6、IL- 8 、CSF、MCP 等。这样 EC 形成的炎症介质就形成一个相互促进的循环,在炎症组织的病理生理中起着重要作用。因此,EC 被认为是体内极其重要的活跃的炎症细胞。与此同时,EC 还合成分泌多种拮抗炎症介质作用的物质,作为调节炎症反应的负反馈信号,以减轻炎症对机体的损害。EC 可生成多种细胞保护剂。例如,PGI_2 可加强 SOD 作用,增加 CAMP;PAF 受体拮抗剂可防止 EC 通透性增强及 GMP-140 激活;SOD 可防止 EDRF (NO)降解;TGF-β 可抑制 TNF 和氧自由基生成,抗 CD_{18}抗体可阻断粒细胞与 EC 粘附;抗 ICAM-1 抗体可阻断 EC 与细胞粘附;腺苷可抑制 PMN,增加 CAMP 等。

6. EC 的免疫功能

主要组织相容性复合体(MHC)是控制免疫应答和疾病易感性的基因群,其编码物质是组织相容性抗原。其中 Ⅰ 、Ⅱ 类抗原在组织移植、免疫监视、免疫遗传过程中有重要地位。Ⅱ 类抗原主要参与免疫调节,直接约束 T_H 对抗原的识别。可溶性抗原不能直接激活 T_H,必须先由具有相同的 MHC- Ⅱ 类抗原的抗原递呈细胞处理后再递呈给 T 细胞,才能引起 T 细胞增殖与分化。

人、猴体内 EC 为 MHC- Ⅱ 类抗原阳性。体外培养的 EC 经 IFN-γ 刺激后,MHC- Ⅱ 类分子 mRNA 水平升高。细胞表面表达 MHC- Ⅱ 分子。TNF、IFN-α、β 抑制 IFN-γ 对 MHC- Ⅱ

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

类抗原的诱导作用，然而，IFN-γ一旦完成了诱导，其他因子就不能使MHC-Ⅱ的表达下降。EC表达MHC-Ⅱ类抗原，说明它是一种抗原递呈细胞。EC还可刺激T细胞活化。培养的人EC可使CD_4^+T细胞生成的IL-2增加3～10倍，而且这种促进作用不是通过IL-1、6或生成的其他因子实现的。说明EC可导致T细胞活化和分泌效应分子，EC在细胞介导的免疫反应中的作用是重要的。

总之，内皮细胞层是一个代谢活跃的组织，它不仅可以调节血管通透性、血管张力和凝血功能，而且是体内最大的代谢和内分泌器官，可以表达多种抗原成分，分泌多种生物活性因子，在炎症、免疫和修复反应中发挥重要作用。

已经证实，正常牙髓中部分EC可以表达MHC-Ⅱ类抗原，炎症牙髓中，MHC-Ⅱ类抗原阳性EC明显增多，说明在牙髓炎症中，EC作为一种抗原递呈细胞积极参与局部免疫应答。内毒素性牙髓炎中，EC可分泌IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α等多种细胞因子，参与炎症反应。Jacoby和吴海珍等曾报道，炎症牙髓中，EC所特有的标志物vWF(von Willebrond factor)含量显著升高，认为该因子在牙髓的自身稳定和修复方面发挥积极作用。原位杂交发现，正常、炎症牙髓组织中的EC均有BMP_3 mRNA表达，而BMP_3可促进牙髓细胞的分化与增殖，并诱导牙本质桥的早期形成。推测，EC参与了牙髓细胞的诱导分化过程。近期的实验显示，炎症牙髓和损伤修复过程的牙髓中可合成分泌大量的TGF-β、EGF、TNF-α等细胞因子，无疑进一步证明了EC是一种具有多种生物学功能的细胞，它通过合成多种活性物质参与了牙髓的炎症和修复反应，在牙髓自身防御中起了不可忽视的作用。

EC 生成的活性介质可以通过多种途径发挥作用:①自分泌作用:活性因子作用于 EC 自身,不仅影响其生长、增殖和分化,而且可以调节其分泌活性,并影响其他介质的功能。②旁分泌作用:影响邻近的牙髓细胞、炎症细胞的生物学行为。另外,由于 EC 始终与血液相接触,它分泌的活性介质可随血流达到牙髓的各个部位,产生更为广泛的影响。所以 EC 是牙髓组织中重要的炎症细胞和修复细胞。

第五节　免疫细胞间的相互作用

免疫应答的产生有赖于免疫细胞及其亚群间的相互作用,而这种相互作用既可以相互刺激,又可以相互抑制,从而使免疫应答在这两种相反作用的调节下,表现出恰如其分的免疫效应。牙髓组织和机体其他部位组织一样,也存在免疫细胞间的相互作用与调节。

一、巨噬细胞与 T 细胞间的相互作用和调节

在免疫应答的感应阶段,MΦ 是主要的抗原递呈细胞,T 细胞在识别外来抗原的同时,还必须识别抗原递呈细胞的 Ia 抗原才能活化,增殖,从而进行有效的免疫应答,因而它们之间具有相互作用与调节的关系,其内容包括:

(1)MΦ 的免疫调节作用。根据 MΦ 表面表达 MHC-Ⅱ类分子的情况,MΦ 细胞可分为两个亚群,即 MHC-Ⅱ类分子阴性亚群和 MHC-Ⅱ类分子阳性亚群。前者只有吞噬功能而无抗原递呈作用,后者才有抗原递呈作用,而且这一作用还受 MHC-Ⅱ类分子数量的影响。因而 MΦ、MHC-Ⅱ类分子的表

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

达以及数量多少是免疫应答的一个调节因素。

(2)MΦ 在抗原递呈时还分泌 IL-1,而 IL-1 是 T 细胞活化的必要信号之一。

MΦ 递呈抗原和分泌 IL-1 均对 T 细胞产生激活作用。

(3)T 细胞接受 MΦ 的刺激活化后,经过增殖和分化形成效应 T 细胞。效应性 T 细胞又可通过其产生一些淋巴因子反过来刺激 MΦ,使其功能增强。MΦ 与细胞间的相互刺激作用,其意义是促进免疫应答的产生和对抗原的消除。

(4)MΦ 对 T 细胞还可以产生抑制作用。M Φ 也是不均一的细胞群,可能存在有抑制性 M Φ 亚群(Suppressor macraphage,MΦs)。巨噬细胞与 T 细胞间相互作用与调节见图 3-1。

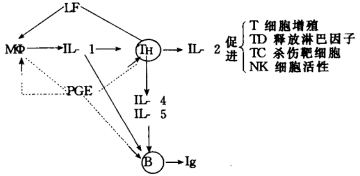


图 3-1 巨噬细胞与 T 细胞间相互作用与调节

二、T_H 细胞对 B 细胞的辅助作用

T_H 细胞的辅助作用,一方面通过与 B 细胞的直接接触相互作用,并在 MHC-Ⅱ类分子的约束下进行;另一方面则通过活化的 T_H 细胞分泌 IL-2、IL-4、IL-5 和 I L-6 等细胞因子的作用来实现。

T_H细胞与B细胞的直接接触可能起到集中和浓缩抗原的作用。其作用为：

(1)在T细胞识别载体，B细胞识别抗原时，在T_H细胞和B细胞之间形成一种"抗原桥"，从而把T_H细胞和B细胞连接在一起，有别于半抗原决定簇集中至B细胞受体上，导致B细胞的活化和增殖分化，成为抗体形成细胞(AFC)，并产生抗体。

(2)通过巨噬细胞间接完成抗原集中作用，即T_H细胞上的受体结合抗原载体决定簇后形成复合物，并由T_H细胞上脱落下来，再结合到巨噬细胞表面，并由巨噬细胞与B细胞相互作用而将抗原带给B细胞，使B细胞能与较多的半抗原决定簇结合而活化，从而起到集中抗原的作用。

三、T_S细胞的免疫调节作用

在免疫应答过程中，与T_H细胞相拮抗的是T_S细胞对免疫应答的抑制作用。人类的T_S细胞表达CD_8抗原，但是，CD_8^+细胞在功能上并非均一的群体。它可分为具有抑制功能的T_S细胞(CD_8^+、CD_{11}^+)和具有细胞毒功能的Tc细胞(CD_8^+、CD_{11}^-)。

T_S细胞不仅能抑制B细胞介导的体液免疫应答，对T_D细胞介导的迟发型超敏反应和T_c细胞介导的细胞毒作用等细胞免疫应答有抑制效应。T_S细胞的抑制作用可能是通过它所产生的可溶性抑制因子(T_SF)来完成的。

在免疫应答过程中，T_H与T_S细胞既对立又统一，二者相互协调，共同维护免疫应答的平衡与稳定。当T_S细胞功能低下，机体将出现过强的免疫应答，从而导致免疫病理。当T_S

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

细胞功能过度活跃时，将会抑制正常的免疫应答，导致低丙种球蛋白血症和免疫监视功能低下。因而 T_S 细胞对免疫应答的抑制作用具有重要意义。

主要参考文献

1. 吴敏毓，刘恭植编著．医学免疫学．合肥：中国科学技术大学出版社，1993
2. 吴海珍，文玲英，王泊云．用免疫组化法对正常和炎症牙髓中免疫细胞的研究．牙体牙髓牙周病学杂志，1993,3(3):154～157
3. 吴海珍，文玲英，王泊云．正常和炎症牙髓中 HLA-Ⅰ类抗原表达细胞的免疫组化研究．牙体牙髓牙周病学杂志，1992,2(1):23～25
4. 金伯泉主编．细胞和分子免疫学．西安：世界图书出版公司．1995
5. 边棣综述．肥大细胞在免疫和炎症中的作用及药物对其影响．国外医学：免疫学分册，1986，2:78～81
6. 张亮林综述．肥大细胞的分子生物学及其生物学效应新进展．国外医学：免疫学分册，1995，4:200～203
7. 文玲英，马福成．人牙髓中的肥大细胞．实用口腔医学杂志，1989,5(2):108～110
8. 文玲英，李伟英，李益民．炎症牙髓的抗体产生细胞．华西口腔医学杂志，1984,2(4):214～216
9. 文玲英，潘苏，孙庆妹．实验性牙髓 Arthus 炎症反应．华西口腔医学杂志，1986,4(4):253～255
10. 吴其夏主编．体液因素和血液循环病理生理学．北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1991
11. 侯鲁虹综述．α-肿瘤坏死因子．国外医学：创伤与外科基本问题分册，1992,13(3):143～145
12. 杨宗城，高建川．血管内皮细胞在烧伤脏器损害发病中的作用．中华整形烧伤外科杂志，1995,11(3):225～228
13. 吴海珍，文玲英．正常、炎症牙髓中内皮细胞和 von Willebrand 因子．牙体牙髓牙周病学杂志，1993,3(3):158～160
14. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, et al. An immunohistochemical study of

the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of helerogencous populations, in normal rat molar pulp. J Dent Res, 1992,71:1196～1202
15. Akagawa KS. Effects of granulocyte- macrophage colony- stimulating factor and colonystimulating factor-1 on the proliferation and defferentiation of murinc alvcolar macrophages. J Immunol, 1988,141:3844～3846
16. Van Furth R. Disselhffder DMMC Dual origin of mouse spleen macrophages. J Exp Med, 1984,160:1273～1278
17. Baumann H, Gauldic J. Acute phase response. Immunol Today, 1994,15: 74～80
18. Jontoll M, Bergenholtz G, Schcynius A, et al. Dendritic cells and macrophages expressing class Ⅱ antigens in the normal rat incisor pulp. J Dent Res, 1988,67: 1263～1266
19. Jontell M, Jiang W, Bergenholtz G. Ontogenety of class Ⅱ antigen expressing cells in rat incisor pulp. Scand J Dent Res, 1991,99:384～389
20. Jontell M, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. J Dent Res, 1987,66:1149～1153
21. Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M. Class Ⅱ antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. Int Endod J, 1991,24:8～14
22. Mantesano R, Orci L, Vassalli P. Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte Interleukins. J Cell Physiol, 1985,122(3): 424～434
23. Bussolino F, Canmussi G, Aglietta M, et al. Human endothelial cells are target for platelet activating factor. J Immunol, 1987,139(7):2439～2446
24. Stophen AH, Guinan EC, Walter F, et al. Recombinant tomor necrosis factor and immume interferon act singly and combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. Am J Pathol, 1986,123(1):16～24
25. Harrison DG, Micheal AK, James EQ, et al. Normal and pathophisilogic considerations of endothelial regulation of vasculartone and their relevance to nitrate therapy. Am J Cardiol, 1992,70(8):11B～17B
26. Pober JS, Gimbrone MA, Lapierr LA, et al. Overlapping pattems of activa-

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

tion of human endothelial cells by IL-1, TNF and IFN. J Immunol, 1985, 137(6): 1893～1896

27. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, et al. Vascular cell adhesion moecule- 1 mediated lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. Blood, 1990, 76(6): 965～969

28. Pober JS, Berilacqua MP, Mendick DL, et al. Two distinct monokines, IL-1 and TNF, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. J Immunol, 1986, 136(5): 1680～1687

29. Messadi DV, Pober JS, Fiers W, et al. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. J Immunol, 1987, 139(5): 1557～1562

30. Alberto M, Elisabetta D. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. Immunology Today, 1989, 10(11): 370～375

31. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Sythesis and release of platelet factor by human vascular endothelial cels treated with TNF or IL-1α. J Biol Chem, 1988, 263(24): 11856～11861

32. Braquet P, Paubert BM, Koltal M, et al. Is there a case for PAF antagouists in the treatment of ischemic states? Trends Pharmacol Sci, 1989, 10(1): 23～29

33. Lapierre LA, Fiers W, Pober JS. Three distinct classes of regulatory cytokines control Endothelial cell MHC antigen expression. J Exp Med, 1988, 167(3): 794～804

34. Pober JS, John D, Christro pher CW, et al. The potential role of vascular endothelium in immune reactions. Human Immunology, 1990, 28: 258～262

第四章　牙髓中的细胞外基质

细胞外基质(Extracellular matix，ECM)是在个体发育过程中由细胞合成并分泌到细胞外的生物大分子所构成的网络状物质，分布于细胞之间或细胞表面。

细胞外基质是正常细胞维持生存、分化和运动的适宜外环境。同种或异种细胞通过细胞外基质连接在一起，形成相应的组织和器官。细胞和细胞之间，以及细胞与细胞外基质之间的相互作用对于完成细胞的功能是必不可少的。

近年已证明，细胞的增生、分化和运动、伤口愈合，钙化作用、水与电解质的分布等都与细胞外基质有着密切的关系，并且，它们在细胞的认识、迁移、增殖、形态发生、功能、保护以及组建等方面起着非常重要的作用。

细胞外间质是牙髓中各类细胞生存的外环境，也是牙髓组织和牙本质的主要构成部分，它对牙髓细胞和组织的生物学效应是：①影响细胞的形态；②控制细胞的迁移；③调控细胞的增殖。

目前，根据细胞外基质的分子组成，可将其分为糖蛋白和蛋白多糖，前者包括胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、硫酸软骨素、肝素、透明质酸、硫酸角质素等，后者包括核心蛋白和若干氨基多糖侧链组成的大分子。纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等又称非胶原糖蛋白。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第一节 胶原

一、胶原的结构、组成和分类

1. 胶原的结构和组成

胶原(Collagen)是一类结构复杂的蛋白质，也是每个器官中细胞外基质的重要组成部分。胶原虽是一类纤维状的蛋白状多聚体，但并不是某一个蛋白质的名称，而是在结构上既有共同特点又有差异的一组蛋白质，是由它的前体原胶原分子按照一定的形式排列聚合而成的。原胶原分子是由 3 股 α 肽链组成的超螺旋体，肽链之间有分子内交链。胶原分子还含有糖的侧链，但由于侧链很短，且不含唾液酸，故也可不列入糖蛋白而单列为一类。

2. 胶原的类型

根据原胶原分子 α 肽链构成，氨基酸组成和立体结构的不同，目前已将胶原分子分为 17 种类型，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型属间质性胶原，其余皆属膜胶原，其中有些类型的胶原还研究得不够清楚。

Ⅰ型胶原：由 2 条 α_1 及 1 条 α_2 链组成，为含量最多的一类胶原，主要分布于皮肤、骨、腱、牙本质和其他纤维组织中，呈纤维状。

Ⅱ型胶原：由 3 条 α_1 链组成，是软骨和玻璃体的主要结构蛋白，呈纤维状。

Ⅲ型胶原：由 3 条 α_1 链组成，也呈纤维状。首先见于胎儿皮肤，且含量特别丰富，是胚胎发育中出现最早的胶原成分。

Ⅲ型胶原总是与Ⅰ型胶原同时存在于相应的组织内，主要分布于结缔组织的间质中，又称为间质胶原，分布在不同组织器官周围的基质中，Ⅲ型胶原有一种生理沉积趋向，远离交界部位的分布浓度逐渐降低，这一分布特点说明，代表新生胶原的Ⅲ型胶原在组织器官周围起着重要的填空支架作用，维护组织器官的正常形态和功能，作为"快速生长胶原"的Ⅲ型胶原，无疑对于不断更新代谢的活体组织器官的正常形态和功能的维持起着重要的保障作用，较其他胶原更具有特殊意义。Ⅲ型胶原的合成和降解较快，更能适应组织器官形态结构的变化，与机体组织、细胞的分化、成熟和损伤修复等密切相关。

Ⅳ型胶原：由 α_1 和 α_2 组成为基膜所特有，故又称基膜胶原，其分子呈绳索状，长约 360nm，形成一种开放的非纤维网络，此网状是通过胶原分子的相同末端联结产生的，并形成片状结构。

Ⅴ型胶原：由 α_1、α_2 或加上 α_3 组成，含量不高，但广泛分布于大多数间充质组织中，聚合为小纤维的形式，有异质性，有多种功能。新近证明Ⅴ型胶原有 4 种分子亚型。利用双标记免疫电镜证实Ⅴ型胶原常存在于Ⅰ、Ⅲ型胶原微原纤维核心部，因而其量虽甚微却可能与纤维化过程的始发机制有关。

Ⅵ型胶原：又称内膜胶原，也分布在大部分间充质组织中，以微小原纤维形式存在，其作用尚不太清楚。

Ⅶ型胶原：又称"长链"胶原，和固着纤维类似，能使基膜连接于基质组织。

Ⅷ型胶原：由胶原分子串联成小螺旋，见于一部分内皮细胞，又称为内皮细胞胶原。

Ⅸ型胶原：为短链胶原，含有某些非螺旋结构组成，是软

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

骨胶原中的一种次要成分，均匀分布于整个软骨基质中。

X 型胶原：也为短链胶原，它有一种相当短的胶原螺旋，并在一端具有球状结构域。

二、胶原的来源与作用

1. 胶原的来源

最初认为只有纤维细胞可以产生胶原。即在纤维细胞的细胞质粗面内质网上合成的胶原分子，利用细胞内膜系统进行运输，将胶原分子排出质膜，进入细胞外空间，或是通过释放原胶原分子到细胞外，然后在那里聚合为胶原纤维。后来发现基板(Basal lamina)下面的成纤维细胞有发育完好的内质网，可以合成分化胶原。继而证明其他类型细胞，如成牙本质细胞、神经上皮细胞、角膜上皮细胞、软骨细胞等也合成和分泌胶原物质。

2. 胶原的作用

(1)作为细胞间相互作用的支架，并作为迁移细胞的附着基质，还可指导细胞的迁移。

(2)刺激上皮分化、维持上皮生长。

多数情况下，胶原并不是单独存在而起作用的，它是和层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、氨基多糖等相联形成一种复合物形式协同发生作用的。这些作用是通过胶原与其细胞膜受体的相互作用，影响细胞骨架而引起的。

三、人牙髓组织中的胶原

胶原是牙髓组织中主要细胞外间质成分，占人牙髓有机成分的 34%，主要为Ⅰ、Ⅲ型，并有大量Ⅳ型胶原。Ⅰ型胶原

在前期牙本质分布密度较高，其纤维粗大，具支持、保护、赋予组织能力的作用。原位杂交和免疫组化均表明成牙本质细胞合成和分泌Ⅰ型胶原，它形成前期牙本质和牙本质的网架。

Ⅲ型胶原是胚胎时期最早出现的胶原之一。前期成牙本质细胞和间质细胞分泌合成Ⅲ型胶原。在牙髓中Ⅲ型胶原呈网状分布，分布密度较高，其中成牙本质细胞层，乏细胞层和多细胞层中的Ⅲ型胶原分布密集，牙髓中央区的神经血管周围沉积较多，前期牙本质内也见有细丝状排列，牙本质中也有少量分布。

因Ⅲ型胶原与机体组织、细胞的分化、成熟和损伤修复等密切相关。牙髓中Ⅲ型胶原的分布与纤维粘连蛋白（Fibronectin，FN）的分布有密切关系，有FN存在的部位都有Ⅲ型胶原存在。van Amerongen（1984）和Karjadainen（1986）等指出，牙髓中的FN可随Ⅲ型胶原的出现而出现，随其变动而变动，FN与Ⅲ型胶原的结合胜过与其他胶原的结合。由于Ⅲ型胶原和FN分布的一致性，以及与FN的结合力，无疑对牙髓愈合能力起了有效的保障作用。

同时，牙髓中还存在少量的Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型胶原，它们在根髓的分布密度高于冠髓，Ⅳ型胶原仅见于牙髓血管基膜上。

第二节　纤维粘连蛋白（FN）

一、FN的组成和存在形式

1. FN的组成

FN是一族具有高度粘附活性的非胶原糖蛋白，分子量为440 000，它由两条或更多的肽链及一些低聚糖所组成，每

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

条肽链亚单位的分子量为 210 000～250 000，包括一半紧密折叠的球形部分。这些部分特异地和其他分子相结合，故 FN 执行的就是这样的配体功能。FN 有三种类型的同系物，即Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ型，90%以上的 FN 序列是由这 3 种同系物重复组织而成。

2. FN 的存在形式

FN 是构建间充质组织的主要糖蛋白，几乎分布在人体所有部位。主要以两种形式存在：一种由肝细胞和内皮细胞合成，称为血浆纤维粘连蛋白(Plasma FN)；另一种是由不同类型细胞合成的，包括成纤维细胞、星状胶质细胞、早期间充质细胞、巨噬细胞、肥大细胞和培养的上皮细胞等，以不溶的形式沉积于细胞表面、细胞外基质、细胞间隙、基膜和结缔组织中，称为细胞纤维粘连蛋白(Cellular FN)，可使细胞发生粘连并建成组织。血浆中的 FN 可渗入到组织和细胞外基质中，并被结合到细胞层内。正常人血浆 FN 的浓度为 300～400μg/L，血清中含量较血浆低。

FN 的合成是在粗面内质网上进行的，成熟的 FN 可分泌到细胞外间质中，也可存在于细胞表面。血浆 FN 是二聚体；细胞 FN 以多聚体为主，也含有少量二聚体和单体，它们之间的基本结构不尽相同。

FN 在体内有三种存在形式：①血浆及其他体液中的可溶性的二聚体；②细胞表面的难溶性寡聚体；③ECM 中的难溶性多聚体。不同组织来源的 FN 亚单位的结构不尽相同，但共同的特点是由一些重复的氨基酸序列构成若干结构域。其间由对蛋白酶敏感的肽段连结。每个结构分别与不同的大分子或细胞结合，包括胶原、肝素、纤维蛋白、血小板反应蛋

白、肌动蛋白、凝血因子Ⅻα、多胺、转化增强因子、Vitronectin、DNA及多种正常真核细胞。

FN与细胞之间有4个结合位点：

第一个结合位点是含有RGDS〔精-甘-天冬-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser)〕的多肽，RGDS在FN的序列中只出现一次，是在Ⅲ型重复之中。此多肽对成纤维细胞的亲和性低，它促使粘连的活性比完整的FN弱。

第二个结合位点是在FN分子的N端，距RGDS约有300个氨基酸，此位点的粘连能力也低，但在和RGDS的协同作用下，则可产生紧密的细胞粘连。

其余两个位点都在ⅢCS段，一个位于FN的C端，另一个位于ⅢCS的N端，它们都可介导细胞的粘连。

由于这些多结合位点，使FN在细胞与细胞、细胞与基质的粘连中发挥其生物学效应。

二、FN的生理功能

FN的生理功能主要是介导细胞间及细胞与基质的粘连。发生粘连的机制可能是：FN分子二肽链上的细胞结合位点都各自与一个细胞表面受体结合，导致两个细胞连在一起；细胞和胶原的联接，可能是由于FN上细胞结合位点和细胞表面受体结合，FN的胶原位点与胶原结合，从而将细胞和胶原联在一起，即FN可介导铺展着的细胞粘连于胶原。

FN可促进细胞的迁移，同时又可使胚胎细胞锚定于底物(Subtrate)上静止不动。FN的这种迁移和锚定的双重功能是由于迁移和静止的细胞之间与细胞骨架相互作用上的差异造成的。通过细胞膜和细胞骨架的相互作用，加强了FN、FN

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

受体和细胞骨架之间的结合力量，使细胞对底物产生强而稳定的附着，导致细胞完全处于静止状态。

FN 还可介导细胞的运动和细胞转化，称为固相支持物和化学趋向性物质。在组织创伤修复中，FN 出现最早，它作为新的组织支架和趋化物从细胞内向伤口移动，也作为调理素促进巨噬细胞吞噬一些损坏的组织碎片和促进创伤的修复。

在创伤修复中，FN 不仅可刺激成纤维细胞增殖，其本身作为一种化学趋化物质，吸引成纤维细胞和血管内皮细胞向创伤区移动，进入创伤区的成纤维细胞本身又可迅速地合成、分泌大量 FN 和 Ⅲ 型胶原，二者共同沉积于基质内，成为细胞外基质的主要成分。当肉芽组织成熟时，FN 与 Ⅲ 型胶原减少并为 Ⅰ 型胶原所替代。FN 还可刺激单核细胞，使其活跃地合成和分泌成纤维细胞生长因子，并刺激血管内皮细胞的生长，作为生长促进因子促进伤口的愈合。

FN 在创伤修复中的作用有：趋化作用，调理作用，作为细胞迁移的基质，为伤口愈合提供基质支架以及止血和抗血栓作用等。

三、FN 在牙髓中的分布和作用

1. FN 在牙髓中的分布

在人正常牙髓的组织中，FN 呈细纤维网状分布于前期牙本质，成牙本质细胞层和牙髓中心区，其中成牙本质层附近的乏细胞层和多细胞层极为丰富。在成牙本质细胞突离开细胞的部位，以及成牙本质细胞彼此相粘连的部位呈致密分布。牙髓中心区胶原增多的部位和血管神经束周围分布也明显增

多，有的呈网状，有的呈条索状。在成纤维细胞的表面和外围可见 FN 的纤细网状结构，前期牙本质内呈细丝状排列，而钙化牙本质内未见有分布。

免疫组化电镜观察，FN 在细胞与细胞、细胞与胶原纤维、胶原纤维与胶原纤维、胶原纤维与无定形基质、血管神经束膜与基质之间呈窄带状分布。特别是成牙本质细胞膜表面，分布密度较高。

在人牙炎症牙髓组织中，FN 在牙髓外层的细纤维状排列不明显，牙髓中央区除部分血管周围密度稍高外，均为均质状分布。此种分布状态可能有助于炎症的局限化，有利于游出的炎细胞及组织内的吞噬细胞及时捕捉、吞噬牙髓组织内的外源性和内源性抗原。经图像分析，正常和炎症牙髓外层的 FN 分布密度远高于牙髓中央区；正常牙髓中央区的 FN 分布密度远高于炎症牙髓的中央区。表明炎症情况下组织和细胞的变性、生理功能的改变，均可导致 FN 的合成减少和(或)FN 消耗过度。

2. FN 在正常牙髓中的作用

(1)使成牙本质细胞有规律地排列在牙髓组织的外围和前期牙本质内层，发挥其形成牙本质基质的功能。FN 在维持成牙本质细胞突和牙本质的位置关系上起重要作用。

(2)牙髓中 FN 合成的主要细胞是牙髓成纤维细胞。培养的人牙髓细胞分泌和表达 FN，它参与调节细胞的分化过程。成熟的 FN 可分泌到细胞外间质中，也可存留在细胞表面，位于细胞间质中的 FN，可维持细胞外微环境的稳定，使细胞外间质各种成分有机地组合，并使牙髓细胞稳定于无定形的细胞外间质的网络之中。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

3. FN 在损伤牙髓中的作用

(1)参与和介导牙髓细胞的移动和分泌,使露髓深部的牙髓细胞大量分裂增殖迁移至露髓处，分化为新生的成牙本质细胞,发挥相应功能,沉积牙本质。

(2)成为新生成牙本质细胞的固相支持物。

(3)在牙本质修复中起初始牙本质发生的基底膜的作用。

(4)在牙本质矿化中起启动作用。在 FN 的启动作用下,牙本质基质矿化,修复创面,达到硬组织愈合。

因此,FN 可能参与损伤牙髓修复的全过程,它和牙髓的自我修复潜力密切相关。

在采用四唑盐比色法(MTT)和胸腺嘧啶核甘(^{3}H-TdR)掺入方法测定 FN 对人牙髓增殖、DNA 合成影响试验中,发现培养液中 FN 浓度为 40～20μg/ml 时,可显著促进人牙髓成纤维细胞增殖和 DNA 合成。FN 对人牙髓成纤维细胞的作用符合典型的正增殖反应,即低浓度时刺激生长,高浓度时抑制生长的双相反应。若在损伤牙髓中应用 FN 的复合制剂,可能使细胞迅速粘附,造成新的成牙本质细胞分化所需的界面。

第三节　层粘连蛋白和体外结合素

一、层粘连蛋白的结构

层粘连蛋白(Laminin, LN)是一个大的糖蛋白分子,约含 13%～15%的糖,为 4 股绞合的细长结构、由 3 种被二硫

键连接糖基化亚单位多肽链构造而成。

LN 的分子构造，可能有 2 种模型：①由 3 个短链的二硫键连于长链。②两条短链，各以其一端靠近中心处缠绕于长链。

LN 和其他细胞外基质成分相结合，包括Ⅳ型胶原、硫酸类肝素蛋白多糖、Etactin、Nidogen 和肝素。它们的结合位点分别是：Ⅳ型胶原结合位点在短链上，肝素结合位点在长链的球状域，细胞表面结合位点在 2 或 3 个短链的交接处，Nidogen 结合位点在一个短链上。

LN 存在所有基膜中，主要分布在基膜的透明层(Lamina lucida)，是基膜中最丰富的成分和基膜中的各种组成相结合互相连接形成整合的复合体。由于它和多方面的相互作用，LN 在维持基质的稳定以及将细胞锚定于基膜上起重要作用。

二、层粘连蛋白的生物学作用

LN 的生物学活性大多是由细胞表面对 LN 的特异受体介导的。

1. 细胞粘连作用

LN 对细胞的粘连性很强，很低的浓度(5μg/ml) 即可促进各种上皮细胞附着在Ⅳ型胶原底物上。LN 能结合于细胞表面或胶原，对上皮细胞和Ⅳ型胶原的结合效果更佳。此时，细胞可迅速粘附并伸展或延长。某些成纤维细胞不识别 LN，故在培养条件下，如介质中包含过量 LN 时就不能成活。但有一类胚胎成纤维细胞能识别 LN，能在 LN 存在条件下生长。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

2. 促进细胞生长

LN 能促进不同类型的细胞生长。由于 LN 可对基质的组装起作用，而基质能促进细胞的生长，故 LN 对细胞生长起作用是由于对细胞提供了适宜的底物。

3. 对细胞形态的作用

某些细胞在 LN 的作用下可改变细胞的形态，使之显示出活体内细胞群的特点。

4. 对细胞分化的作用

体外细胞培养研究表明，LN 对细胞分化起作用，特别对上皮的形成和 F_9 细胞的分化尤为明显。

5. 基质组装(Matrix assembly)作用

LN 作为基膜的主要成分能和基膜的各种成分，包括Ⅳ型胶原、硫酸类肝素蛋白多糖、Entactin 和 Nidogen 等相结合。由于 LN 具有多方面的相互作用，故它在基膜基质的组建中起重要作用。

三、体外结合素和硫酸软骨素

体外结合素(Vitronectin，VN)是一种多功能球蛋白，主要存在于血浆和细胞外基质中，属细胞粘附蛋白，在细胞的增殖、分化、创伤愈合和组织修复中起重要的调节作用。

在牙髓组织中，VN 是不规则细丝状弥漫分布，其中成牙本质细胞层、牙髓血管神经周围和胶原纤维表面及它们之间分布致密，其余部位分布稀疏。

Bortold(1993)通过软骨素酶 ACⅠ和软骨素酶 ABC 消化，结合 McAb 和免疫过氧化物酶技术研究发现，硫酸软骨素广泛分布于牙髓结缔组织中，尤以成牙本质细胞层和前期

牙本质中最多，提示硫酸软骨素在成牙本质细胞形成牙本质及牙本质矿化过程中具有重要作用。

第四节 细胞外基质在牙齿发生、发育过程中的作用

牙齿的发生和发育过程是研究上皮-间质相互作用导致器官发生，了解细胞之间及细胞与细胞外基质相互关系的良好模型。

牙齿的发生来自于牙板上皮，当牙板上皮进入间叶组织内，牙齿的发育则进入芽状期(Bud)、帽状期(Cap)和钟状期(Bell)，从此发生牙胚。牙胚是由来自外胚叶的造釉器(Enamel orgen)和来自中胚叶的牙乳头(Dental papilla)构成。造釉器由内釉上皮(Inner enamel epithelium)、外釉上皮(External enamel epithelium)、星网层(Stellate reticulum)和中间层(Stratum intermedium)组成。牙乳头由未完全分化的间叶细胞组成，并以一层基底膜(Basement membrance)与造釉器分开。造釉器形成牙齿的釉质，牙乳头形成牙本质和牙髓。包在造釉器外并限制牙乳头的浓缩间叶组织为牙囊(Dental follicle)，日后牙囊可形成牙齿的支持组织。

牙本质是由成牙本质细胞形成的，其成牙本质细胞则由牙乳头间叶细胞分化而成，成牙本质细胞的分化来源于内釉细胞的诱导。成牙本质细胞的分化早于成釉细胞，在成牙本质细胞分泌的牙本质开始矿化时成釉细胞才分泌釉质。

细胞外基质在牙齿的形态发生和细胞分化方面起着重要作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

一、FN在成牙本质细胞分化期间的分布特征与作用

(1)在牙胚钟状期前,尚未出现成牙本质细胞分化时,FN即分布于牙尖发生处的细胞聚集区。

(2)在牙乳头细胞分化为成牙本质细胞前,细胞分化和聚集的区域,以及细胞和细胞外间质中FN含量明显增加。

(3)当出现成牙本质细胞和前期牙本质时,FN即分布于成牙本质细胞与前期牙本质界面、成牙本质细胞突起,成牙本质细胞顶端胞浆内、细胞之间的连接处。尤为明显的是牙乳头间质细胞向牙本质细胞分化时,基底膜上皮-间质界面的FN含量增多。即正处于极化过程中和有功能的成牙本质细胞的顶端聚积着FN;在分泌牙本质的有功能的成牙本质细胞之间的FN呈纤维状结构;牙乳头内的FN浓度呈梯度状态,从乳头基部至牙尖端逐渐增高。

由此可见,FN在促进成牙本质细胞粘附于前期牙本质,维持细胞处于极化状态;在加强成牙本质细胞的相互粘附,形成前期牙本质与乳头间质组织之间的屏障方面起着极有效的支架作用。它还参与牙乳头间质细胞向牙本质细胞分化时的调节过程。它的分布对维持成牙本质细胞功能有着重要意义。

二、Ⅲ型胶原在成牙本质细胞分化期间的分布特征与作用

(1)在牙胚发育过程中,Ⅲ型胶原包围着牙乳头间质细胞,并在极化过程中的成牙本质细胞顶端聚积。在牙乳头内也呈梯度分布,从乳头基部到尖端顶部逐渐减少。

(2)当尚未出现成牙本质细胞分化时,Ⅲ型胶原分布于上

皮和间质的界面。

(3)随着成牙本质细胞的分化，Ⅲ型胶原从上皮和间质的界面中消失。成牙本质细胞分化完成后，胞外Ⅲ型胶原仍存在，但非牙本质细胞所合成和分泌。由于Ⅲ型胶原与FN有较强的亲和力，Ⅲ型胶原与FN一道可能起到细胞聚集、增殖和分化的支架作用。

(4)在牙齿发育期牙乳头细胞分化前，上皮-间质组织界面存在着Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ型胶原。Ⅴ型胶原存在于鼠的前期成牙本质细胞和成牙本质细胞，但新形成的前期牙本质中不含此型胶原。

主要参考文献

1. 郑国昌，翟中和主编. 细胞生物学进展(第2卷). 北京：高等教育出版社，1991. 18～24
2. 李玉端. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京：人民卫生出版社，1989. 100～142
3. 文玲英，吴海珍，王伯云. 年轻恒牙牙髓中几种细胞外基质的分布特征. 中华口腔医学杂志，1994,29(3):186～188
4. 周迁中. 多肽生长因子(基础与临床). 北京：中国科学技术出版社，1992,75
5. 汪平，郝建军，史俊南. 牛血浆纤维粘连蛋白对人牙髓成纤维细胞增殖、DNA合成、细胞形态的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志，1995,5(2):80～82
6. 汪平，史俊南，郝建军. 人牙齿胚胎发育的免疫组化研究. 牙体牙髓牙周病学杂志，1995,5(4):220～221
7. Provenza DV, Seibel W. Oral histology: inheritance and development 2nd ed philadephia: Lea and Febigor, 1986,29～307
8. Karjalainens, Soderling E, Pelliniemi L, et al. Immunohistochemical localization of type Ⅰ and Ⅲ collagen and Fibronectin, in the dentine of carious human teeth. Archs Oral Biol, 1986,31:801～806

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

9. Van Amerongen JD, Lemmens IG, Tonino JM. Immunifluores cent localization and extratability of Fibronectin in human dental pulp. Archs oral Bial, 1984,29:93～99

10. Thesleff I. Interaction between the extracellular matrix and the cell surface determine tooth morphogenesis and the cellular differtiation of the dental mesenchyme Ontogeneze, 1989,20(4):341

11. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of odontoblast lager. J Dent Res, 1985,64(spe):489

12. Yoshiba N, Yoshiba K, Iwagu M, et al. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. Arch Oral Biol, 1994,39(5):395

13. Tziafas D, et al. Dentinogenic activity of allogenic plasma fibronectin on dog dental pulp. J Dent Res, 1992,71(5):1189

14. Veron MH, et al. Expression of fibronectin and type I collagen by human dental cells and gingiva fibroblasts grown in fibronectin. Arch Oral Biol, 1990,37(7):565

15. Bronckers ALJJ, Lyaram DM, Woltgens JHM. Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. Connective Tissue Res, 1989,22(2):65

16. Andujar MB, Coublep, Couble ML, et al. Differential expression of type I and type Ⅲ collagengenes during tooth development. Development, 1991, 111(3):691

17. Kuc MYP, Lan WH, Lin SK, et al. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. Arch Oral Biol, 1992,37(11):945

18. Lukinnaa PL, Waltimo J. Immunohistochemical localization of type Ⅰ、Ⅴ and Ⅵ collagen in human permanent teeth and periodental ligament. J Dent Res, 1992,71(2):391

第五章　细胞因子

细胞因子(Cytokines, CK)是指由多种细胞分泌的,能调节细胞功能的小分子多肽,或指主要由免疫细胞分泌的,在免疫应答、炎症反应和创伤修复中有多种生物学功能的一类低分子量蛋白质。至今,已报道过许多细胞因子,经过深入比较研究发现,有些不同名称的细胞因子实际上是同一物质的不同功能表现,因而有关细胞因子的分类尚未统一。

第一节　细胞因子的分类和共同特性

一、根据产生细胞因子的细胞种类进行分类

1) 淋巴因子(Lymphokine)　于60年代开始命名,主要由淋巴细胞产生,包括T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK细胞等。重要的淋巴因子有IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-11、IL-13 、IL-14、IFN-γ、TNF-β、GM-CSF和神经白细胞素等。

2) 单核因子(Monkine)　主要由单核细胞和巨噬细胞产生,如IL-1、IL-8、TNF-α、G-CSF和M-CSF等。

3) 非淋巴细胞、非单核-巨噬细胞产生的细胞因子　主要由骨髓和胸腺中的基质细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

等细胞产生，如 EPO、IL-7、IL-11、CSF、内皮细胞源性 IL-8 和 INF-β 等。

二、根据细胞因子的主要功能分类

1）**白细胞介素**(Interleukin，IL) 1979 年开始命名，由淋巴细胞、单核细胞或其他非单个核细胞产生的细胞因子，在细胞间相互作用、免疫调节、造血以及炎症过程中起重要调节作用，目前凡命名的白细胞介素的 cDNA 基因克隆和表达均已成功，现已报道 IL-1～IL-15。

2）**集落刺激因子**(Colony stimulating factor，CSF) 根据不同细胞因子刺激造血干细胞或分化不同阶段的造血细胞在半固体培养基中形成不同的细胞集落，分别命名为 G-CSF、M-CSF、GM-CSF 等，不同的 CSF 不仅可刺激不同发育阶段的造血干细胞和祖细胞增殖和分化，还可促进成熟细胞的功能。

3）**干扰素**(Interferon，IFN) 1957 年发现的细胞因子，最初的发现是某一种病毒感染的细胞能产生一种物质干扰另一种病毒的感染和复制而得此名称。根据干扰素产生的来源和结构不同，可分为 IFN-α、IFN-β 和 IFN-γ，它们分别由白细胞、成纤维细胞和活化 T 细胞所产生。各种不同的 IFN 生物学活性基本相同，具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等作用。

4）**肿瘤坏死因子**(Tumor necrosis factor，TNF) 最初被发现能造成肿瘤组织坏死而得此名称。根据其产生来源和结构不同分为 TNF-α、TNF-β 两类，前者由单核-巨噬细胞产生；后者由活化 T 细胞产生，又称为淋巴毒素(Lymphotoxin，LT)。两类 TNF 的生物学活性基本相似，除能杀伤肿瘤细胞

外，还有免疫调节及参与发热和炎症发生等活性。

5）与创伤愈合关系密切的生长因子

（1）表皮生长因子（Epidermal growth factor，EGF），是1959年Cohen在继神经生长因子（NGF）研究之后偶然发现的，1962年Cohen分离出这种因子。1972年，Cohen等弄清了EGF是由53个氨基酸残基组成的多肽，后来又搞清了其一、二、三级结构。EGF具有促上皮细胞和中胚层细胞分裂增殖，促进皮肤和牙齿成熟，抑制胃酸分泌，促进胎盘分泌人绒毛膜促性腺激素，对上皮细胞、内皮细胞、单核细胞有趋化迁移，以及促成纤维细胞合成或分泌胶原酶等作用。

（2）血小板衍生生长因子（Platelet-derived growth factor，PDGF），是1970年由Balk、Ross和Kohler发现和分别证实、在凝血过程中从血小板释放、在创伤过程中起重要作用的细胞因子。PDGF可促进成纤维细胞、平滑肌细胞和神经胶质细胞增殖，对中性粒细胞、单核细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞有趋化迁移作用，可促进成纤维细胞合成或分泌胶原酶，促进中性粒细胞合成或分泌溶菌酶和中心蛋白酶。

（3）成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor，FGF），1974年，Gospoderowicz报道从牛脑垂体中发现一种对BALB/C_3T_3细胞等成纤维细胞生长物质。可促进中胚层和神经外胚层源细胞分裂，诱导新生血管形成，对神经元有营养作用，对内皮细胞和成纤维细胞有趋化性迁移作用，可促进内皮细胞合成或分泌纤溶酶活化剂、胶原酶、胶原和纤维结合素，促进成纤维细胞合成或分泌胶原酶和胶原等。

（4）转化生长因子（Transforming growth factor，TGF），1978年，Delarco和Todaro在小鼠肉瘤病毒转化细胞株的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

条件培养基中鉴定出一种新的活性多肽，这种多肽能与125I-EGF竞争同一受体，刺激正常指示细胞(NRK)发生表型转化，生长接触抑制消失，出现转化细胞所特有的效应，命名为TGF，后来对其充分纯化后才发现，TGF实际上是TGF-α与TGF-β两种物质的混合物。TGF-α本身对正常指示细胞的表型只有微弱作用，它需TGF-β的协同才能诱导停泊不依赖性生长。而TGF-β无论分子组成，膜受体结构，还是诱发的生物学效应，都与TGF-α截然不同，是体内存在的一种极其广泛的调节物质。TGF-β可促进成纤维细胞、成骨细胞、胶原细胞分裂增殖，抑制内皮细胞增殖，增加单核细胞和成纤维细胞的趋化性，促进成纤维细胞合成或分泌纤维结合素、胶原、胶原酶、蛋白酶抑制剂、透明质酸和氨基酸等。

(5)胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor，IGF)，是一族既有胰岛素样合成代谢作用又有生长促进作用的多肽。据不完全统计，生物体内能合成与分泌IGF的细胞有18种之多，人血浆中主要有IGF-Ⅰ与IGF-Ⅱ两种，前者为一种生长激素依赖性的碱性蛋白；后者为一种中性单链多肽。能促进骨细胞、软骨细胞、肾细胞、平滑肌细胞和某些上皮细胞的分裂增殖，促成纤维细胞合成或分泌胶原。

(6)神经生长因子(Nerve growth factor，NGF)，是最早被发现的生长因子，可促进神经元分化、发育，促进B细胞和肥大细胞分裂增殖，对中性粒细胞、单核细胞和成纤维细胞具有趋化迁移作用。

三、细胞因子的共同特性

(1) 均为低分子量的分泌性蛋白质分子，绝大多数为糖

蛋白，分子量为 15 000～45 000。

(2) 主要在局部以旁分泌(Paracrine)或自分泌(Autocrine)的形式产生。通常以旁分泌和自分泌形式作用于附近细胞和细胞本身。在生理状态下，绝大多数细胞因子只在产生的局部发挥作用。

(3) 分布广，几乎存在所有类型的组织中。一种细胞因子可来源于不同类型的细胞，还可对不同类型的细胞起作用。

(4) 具有高效能作用，一般在 pmol/L(10^{-12}mol/L)水平即有明显的生物学效应。

(5) 细胞因子的生物学效应与细胞表面的受体结合、亲和力大小有关。细胞反应的强度决定该因子的局部浓度、细胞类型及其他因子的影响。不同细胞因子常常具有某些相同的生物学活性。

(6) 细胞因子对细胞增殖、分化的调控作用取决于细胞所处的特定环境和功能状态，可表现为促进或抑制等多重调节作用(Multiple regulatory action)。细胞增殖与分化功能的维持需要多种细胞因子协同或逐级发生作用。

(7) 正常静息状态的细胞需经激活后才能合成和分泌细胞因子，细胞因子平时极少贮存。经适当刺激可迅速合成并释放，刺激停止后很快终止合成并降解。

四、细胞因子网络(Cytokine network)作用

(1) 一种细胞因子可诱导或抑制另一种细胞因子的产生和作用，如 IL-1 和 TGF-β 分别促进或抑制 T 细胞 IL-2 的产生。

(2) 一种细胞因子可诱导或抑制另一种细胞因子受体的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

表达，并也可调节本身受体的表达。如 TGF-β 可降低 T 细胞 IL-2 受体的数量，而 IL-6 和 IFN-γ 可促进 T 细胞 IL-2 受体的表达。

（3）一种细胞因子可调节同一种细胞因子受体的表达，如高剂量 IL-2 可诱导 NK 细胞表达高亲和力的 IL-2 受体。

（4）细胞因子除了单独具有多种生物学活性外，彼此间还在诱生、受体调节及生物学效应等 3 个水平上发挥相互作用，构成了一个内容丰富、关系复杂的细胞因子网络。

由此可见，细胞因子作为体内细胞间通讯系统的要素，总是以一定的网络形式参与调控，其效应水平取决于网络系统的整合作用。

由于细胞因子种类繁多，细胞因子间存在协同和制约关系，使其组成的网络极为复杂。目前，细胞因子网络作用的研究已成为免疫学基础和临床免疫学研究的活跃领域。

第二节　白细胞介素（IL）

白细胞介素（Interleukin，IL）是一组由活化的单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞所分泌的、在免疫调节和炎症反应中发挥作用的因子，目前已正式命名有 IL-1～IL-15，并已知许多 IL 是来自单核-巨噬细胞和淋巴细胞以外的许多细胞。

一、白细胞介素-1（IL-1）

IL-1 是单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等在摄取抗原抗体复合物后，或在抗原递呈过程中产生的，表皮细胞、NK 细胞、B 细胞、成纤维细胞、内皮细胞、脑胶质星状细胞、平滑

肌细胞、上皮细胞等在某些条件下亦可产生IL-1。许多因素可以直接影响单核-巨噬细胞IL-1的分泌。例如，在外周血中20pg/ml内毒素刺激单核细胞即可产生IL-1，10ng/ml内毒素可使单核细胞合成IL-1增加100倍，而皮质类固醇和前列腺素则对IL-1的产生有抑制作用。

人的IL-1由不同的cDNA所控制的IL-1α与IL-1β组成，分子量约17 500，其中IL-1α的组成与鼠的IL-1的组成具有62%的同源性，但与IL-1β的同源性仅26%，尽管如此，α与β型的IL-1的生物学活性却很相似。

IL-1的受体在T细胞、成纤维细胞表面，分子量为80 000，B细胞表面的受体分子量则为68 000。编码这两种受体的基因产物不同，P_{80}IL-1R称为IL-1Rt Ⅰ(CDw121a)，P_{68}IL-1R称为IL-1Rt Ⅱ(CDw121b)。

1. IL-1的生物学功能

IL-1的生物学功能是通过与相应高亲和力受体结合而介导的，具有以下功能：

(1)促进胸腺细胞、T细胞的活化、增殖和分化。

(2)促进B细胞功能或促进免疫球蛋白的合成和分泌。

(3)刺激骨髓多能干细胞的增殖。

(4)增殖NK细胞和巨噬细胞产生IL-6和TNF，并通过单核细胞和巨噬细胞产生的IL-8介导对中性粒细胞的趋化作用。

2. IL-1的主要生物学作用

1)发热作用　IL-1是一种重要的发热因子，是一种内源性热原质(Endogenous pyrogen)，炎症所出现的热型与IL-1的生成动态极为一致。极微量纯化的IL-1(约2～3ng/kg体

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

重）即可引起发热现象，但IL-1引起发热作用与内毒素不同，IL-1对热敏感，反复注射不产生耐受。

2）*参与免疫反应* IL-1不仅对T淋巴细胞，同时对B淋巴细胞也有作用，它可以诱导B淋巴细胞的分化，但其本质是针对T细胞的。T细胞对抗原或丝裂原的刺激发生增殖反应时需要有MΦ参加。如果体外培养时除去MΦ，则T细胞对刺激物的反应极低，加入IL-1后，反应又大大增加。这一现象说明IL-1对T细胞有增殖作用，这种作用是通过IL-1刺激T_H细胞产生IL-2实现的。因IL-1可促进T_H细胞分泌IL-2，故又称为"IL-2释放激素"。

IL-1不仅可诱导T细胞产生IL-2，同时还诱导T细胞产生IL-2受体，它既能诱导产生IL-2，又能加强IL-2对T细胞的反应，所以IL-1是促进免疫功能增强的重要因素。

IL-1对B淋巴细胞的直接作用有增殖和抗体产生的增幅作用，而且这种作用又可以由IL-4、IL-5协同而加强。同时，IL-1还可诱导B细胞增殖分化因子IL-6，通过这种细胞因子网络对B细胞的功能起着调节作用。

IL-6可促进肝细胞合成急性期蛋白（Acutephase protein），有利于机体抵抗病原微生物的侵袭，是机体非特异性防御因素之一。

3）*参与炎症反应* 炎症早期可以出现发热、外周白细胞增多和游出现象。白细胞向组织内游出，首先必须向血管内皮细胞粘附。IL-1作用于内皮细胞，诱导细胞表面合成内皮细胞粘附因子，对中性粒细胞及单核细胞的粘附及游出起主要作用。

IL-1在炎症反应中的作用是复杂的，一是作为一种内分

泌激素激发全身与局部的炎症反应，使机体处于应激状态；二是作为旁分泌或自分泌激素(Paracrine 和 Autocrine)对免疫系统内其余细胞或自身细胞起一定调节作用(图 5-1)。

4)抗肿瘤作用　IL-1 协同 IL-2、IFN 诱导 CTL 和 NK 细胞的杀伤活性，促进杀伤细胞 IL-2 受体表达以及成纤维细胞分泌 IL-6，而且有抗肿瘤作用。

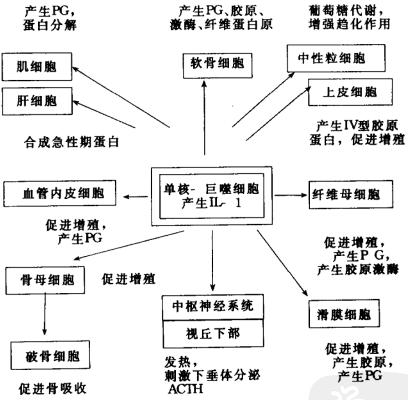


图 5-1　IL-1 在炎症反应中的作用

3. 牙髓中的 IL-1

牙髓中的细胞因子是由 D'souza 于 1989 年首先对 IL-1 进行研究的。D'souza 采用^{3}H-胸腺嘧啶核苷结合 D10. G4. 1

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

细胞系核素测定法，检测健康牙和龋病、牙周病的牙髓组织匀浆上清液中 IL-1 的活性。结果表明，有临床症状的龋病牙髓中 IL-1 的活性明显高于其他组。用抗 IL-1 单克隆抗体免疫组化证明，产生 IL-1 的细胞为牙髓基质中的 α-萘基乙酸酯阴性 MΦ。因为大量的 IL-2 存在时也能激活上述细胞系的增殖，而不能刺激小鼠 NK 细胞增殖，所以又应用 NK 细胞增殖法检测，有症状龋病牙髓中的 IL-2 并无明显差异。由于 IL-1 可由微量的抗原刺激而大量产生，有效地诱导机体产生防御反应，以及急性炎症局部的中性粒细胞是 IL-1 的主要产生细胞，而有症状的龋病牙髓中的 MΦ 为 IL-1 阳性细胞。由此说明，龋源性牙髓炎大多是慢性炎症的原因，牙髓组织可在龋病抗原的持续作用下，在 IL-1 的介导下，渐渐出现以防御为主的免疫应答反应。

近年的研究证实，IL-1β 等细胞因子与尖周病、牙髓病的病变程度、临床症状密切相关。在采用 L 基因重组型 IL-1β，应用^{3}H-TdR 细胞内掺入技术定量检测 IL- 1 β 对人牙周膜纤维细胞（Human periodontal ligament fibroblast，HPLF）的 DNA 合成量影响的实验结果表明，IL-1β 具有促进 HPLF 的 DNA 合成作用，该促进作用与 IL-1β 的作用浓度呈正比关系或有显著的浓度效应。产生这种作用的机理可能是 HPLF 膜表面有 IL-1β 受体，当 IL-1β 与 HPLF 膜表面受体结合后，便会引起该受体的立体空间结构发生变化，使受体贯穿于细胞膜的部分发生变形，同时通过激活或抑制一系列相关蛋白激酶调节细胞内生化反应，诱导 DNA 合成，加速细胞分裂、增殖过程，IL-1β 在尖周病、牙周病的纤维化愈合过程中起一定积极作用。

二、白细胞介素-2(IL-2)

IL-2 主要由活化的 T 细胞或 T 细胞系产生。人 IL-2 含有 133 个氨基酸残基，分子量为 15 500。

IL-2 受体仅存在于活化的 T 细胞表面，由 α、β 和 γ 三条链组成，大约每个活化 T 细胞表面可表达 10 000～15 000 个 IL-2 受体。IL-2 同 T 淋巴细胞上的 IL-2 受体结合导致这些细胞增生，增强淋巴因子的分泌，提高其他细胞因子膜受体的表达，以及被诱导的 Ⅱ 类组织相容性复合体(MHC- Ⅱ)的表达。IL-2 对 T 细胞的这些生物效应已扩展到活化巨噬细胞，直接作用于 B 细胞，促进其增殖、分化和 Ig 分泌。现已发现活化的 B 细胞也具有 IL-2 受体，IL-2 对 B 细胞的调节作用除通过刺激 T 细胞分泌 B 细胞增殖和分化因子外，还可能有直接调节作用。此外，IL-2 同自然杀伤细胞(NK)、LAK 细胞及其他细胞毒性细胞的相互作用均可提高其生物学效应，现已开始用于癌症与传染病的免疫治疗。

三、白细胞介素-3(IL-3)

IL-3 刺激骨髓多能干细胞和各系祖细胞的分化与增殖，故又称多功能集落刺激因子(Multi-CSF)，除具有多功能集落刺激作用外，最近发现 IL-3 可刺激皮肤上皮细胞、CD_4-$TCR_\alpha\beta$、CD_8-TCRαβ 细胞、肥大细胞、嗜碱粒细胞的增殖，阻止肥大细胞发生程序性细胞死亡。

四、白细胞介素-4(IL-4)

IL-4 是一种促进 B 细胞增殖的因子，故又称为 B 细胞生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

长因子 I (B cell growth factor 1, B CGF1),主要由活化 T 细胞产生。在小鼠由 T_{H2}亚群产生。成熟的 IL-4 分子由 120 个氨基酸残基组成,分子量为 14 000。人与鼠 IL-4 DNA 水平上有 70%同源性。在小鼠,T 细胞、B 细胞、胸腺细胞、骨髓细胞、巨噬细胞和肥大细胞表面都有 IL-4 受体。IL-4 对 B 细胞、T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞等都有免疫调节作用。

五、白细胞介素-5(IL-5)

IL-5 主要由活化 T 细胞产生,对 B 细胞、嗜酸粒细胞、胸腺细胞和 T 细胞都有作用,其中主要是诱导嗜酸粒细胞的分化和成熟。与其他IL相比,IL-5的生物学活性作用谱相对较窄。

六、白细胞介素-6(IL-6)

1. IL-6 的产生和受体

IL-6 是一种对 B 细胞、T 细胞、浆细胞瘤细胞、肝细胞及其他多种细胞具有作用的多功能的细胞因子。机体中的许多细胞,如 T 细胞、B 细胞、单核-巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、上皮细胞等均可产生。它由 212 个氨基酸残基组成,包括 28 个氨基酸残基的信号序列,成熟的 IL-6 为 184 个氨基酸残基,分子量为 26 000。IL-6 受体(IL-6R)至少由 IL-6 结合蛋白(IL-6 binding receptor protein)和信号指导蛋白(Signal-transducing protein)的 gp130 组成。每个细胞表面受体通常在 100~1 000 之间,表达在激活的 B 细胞、静止的 T 细胞、骨髓瘤细胞等许多细胞表面。通常情况下,IL-6 与 IL-6R 结合后,使 IL-6R 的构象发生变化,并迅速与两个 gp130

分子结合形成高亲和力的结合基因座，通过 gp130 传递信号而使相应基因活化。IL-6 通过靶细胞膜表面特异性的 IL-6 受体，而具有多功能的生物学特性。

2. IL-6 的生物学功能

(1)诱导细胞分化。诱导 B 细胞分化并分泌 Ig(IgG、IgA、IgM)，以及诱导 MΦ、神经细胞、NK 细胞、造血干细胞分化。

(2)促进细胞增殖，如 T 细胞、造血干细胞、肾小球系膜细胞、浆细胞瘤细胞和骨髓瘤细胞。

(3)加速肝细胞急性期蛋白(Acutephase protein)的合成。

(4)抑制细胞生长，如抑制某些髓样白血病细胞系的生长，促进其成熟和分化，抑制乳腺瘤细胞生长，抑制黑色素瘤等。

(5)参与骨的吸收。

(6)参与炎症反应和脏器移植排斥反应。如细菌、病毒感染的脑膜炎脑脊液中，肺部感染的胸腔积液中 IL-6 水平升高。Cers(1988)报道肾移植术后第二天患者尿和血中 IL-6 水平升高，1 周以后，降至正常。如果出现排斥反应，则 IL-6 持续增高。手术后或烧伤后也伴有血清 IL-6 水平升高。目前 IL-6 已作为一个全身炎症性疾病的主要报警信号而越来越被人们重视。

3. 牙髓、牙周组织中的 IL-6

Matsuki(1992)用原位杂交方法，证明正常人牙龈组织中 IL-6 mRNA 的表达很少，而炎症牙龈组织中单核-巨噬细胞、T 细胞、成纤维细胞、内皮细胞、B 细胞等的 IL-6 mRNA 染色阳性，且主要集中于 B 细胞、浆细胞丰富的区域，说明 IL-6 与

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

诱导B细胞成熟并分泌Ig有关。Takahashi(1994)采用PCR技术和免疫细胞化学方法，比较正常、炎症牙龈组织中IL-6 mRNA和IL-6蛋白的表达，结果，炎症牙龈组织中IL-6 mRNA和IL-6蛋白阳性检出率为100%，而正常牙龈组织IL-6 mRNA检出率为50%，IL-6蛋白染色均呈阴性，说明IL-6的分泌与炎症状态下炎细胞的渗出、炎性介质的存在有关。IL-6与牙龈炎、牙周炎的发生、发展和尖周组织破坏有密切关系。

有关IL-6与根尖周组织破坏的关系，文献报道，将外科手术摘除的尖周囊肿进行组织培养，在其培养中检测到大量高活性的IL-1、IL-6，免疫细胞化学染色所有标本的IL-1、IL-6均为阳性，且主要定位于上皮细胞和少量血管内皮细胞。

最近，采用细胞培养、免疫细胞化学等方法对IL-6在人牙髓、牙周组织的细胞生物学效应进行研究，结果表明：①IL-6对人牙髓细胞、牙周膜细胞的生长有一定的抑制作用，并呈时间和剂量依赖关系，IL-6对两种细胞ALP活性无显著影响。②IL-6对人成骨细胞的生长无显著影响，但可使成骨细胞ALP活性增加。③正常牙髓组织渗出液未检出IL-6，炎症牙髓、尖周组织渗出液均有不同含量的IL-6，急性炎症高于慢性炎症，急性尖周炎高于急性牙髓炎，慢性牙髓炎与慢性尖周炎无显著差异。④正常牙髓组织无IL-6表达，炎症牙髓组织IL-6呈阳性染色，主要定位于单核-巨噬细胞、成纤维细胞和少量内皮细胞，说明IL-6参与牙髓、尖周组织的炎症反应，对牙髓细胞、牙周膜细胞的生长有一定的抑制作用。

七、白细胞介素-8(IL-8)

1. IL-8 的产生和受体

IL-8 是由单核细胞产生的一种中性粒细胞趋化因子。IL-1、TNF、LPS 和 PMA 均能诱导单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和表皮细胞合成和分泌 IL-8,且人类多种肿瘤细胞均可表达 IL-8。IL-8 分子量为 8 300,不成熟的 IL-8 为 99 个氨基酸,单核细胞产生的成熟 IL-8 分子量为 72 个氨基酸,内皮细胞产生的成熟 IL-8 分子量为 77 个氨基酸。

IL-8 受体有 IL-8RA 型和 IL-8RB 型,两型受体在氨基酸水平上有 77%同源性。IL- 8RA 特异性结合 IL-8,为高亲和力,受体主要分布于中性粒细胞、单核细胞、T 细胞和黑色素瘤细胞。IL-8RB 除与 IL-8 结合外,还可与分布于中性粒细胞和髓样细胞前体细胞系的其他受体结合。

2. IL-8 的生物学功能

(1)趋化和激活中性粒细胞,发挥其溶酶体酶的活性和吞噬效应。IL-8 激活中性粒细胞后,能促进 I 型和 Ⅲ 型补体受体的表达,从而参与免疫调节和促进细胞粘附。

(2)趋化嗜碱粒细胞,并刺激其释放组织胺,可能与速发型超敏反应的发生有关。

(3)趋化部分静止的 T 淋巴细胞,这种趋化作用需要单核细胞同时存在。局部注射 IL-8 可使局部和引流区淋巴结 T 细胞明显增多。IL-8 还可明显趋化 IL-2 活化的 NK 细胞。

内毒素脂多糖可诱导体外分离培养的人外周血单核细胞产生 IL-8 因子。

大鼠磨牙正常牙髓组织中有 IL-8 表达的阳性细胞,正常

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

牙髓中IL-8表达细胞为成牙本质细胞层和牙髓中央区的圆形、椭圆形或纺锤形的MΦ和少量成纤维细胞。内毒素炎症牙髓组织中,IL-8主要分布于炎细胞浸润区周围的单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、部分成纤维细胞。由于IL-8对中性粒细胞所具有的特异性趋化作用,使中性粒细胞在炎症过程中定向迁移和组织浸润,在宿主抗感染和调节免疫反应中起促进作用,或加重炎症反应和组织破坏。因此,正常牙髓组织中的IL-8可能担负着防御外来抗原入侵的功能,而牙髓炎症中的IL-8则参与早期的炎症反应过程,并可能影响炎症病变的程度和转归。

第三节 肿瘤坏死因子(TNF)

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)是1975年由Cors Wells等首先发现的,可使敏感肿瘤发生出血和坏死,而无损于正常细胞功能的细胞因子。

一、TNF的产生和分类

近年,TNF的研究进展甚速。现已明确,TNF是机体发生应激反应时,主要由激活的单核-巨噬细胞产生的内源性多向性蛋白调节因子。巨噬细胞是产生TNF的主要细胞,机体不同部位的巨噬细胞受各种刺激后都有产生TNF的能力,且单核细胞、NK细胞和B细胞等也能产生TNF和TNF类似物。刺激因子中的淋巴因子与内毒素的联合作用最佳。此外,一些肿瘤细胞本身在一定条件下也能产生TNF。机体内的许多病理因子都是TNF合成的促进剂。1985年Shalaby

把巨噬细胞产生的TNF命名为TNF-α，把T淋巴细胞产生的淋巴毒素(Lymphotoxin，LT)命名为TNF-β。TNF-α是一种单核因子，TNF-β是一种淋巴因子，抗原和丝裂原均可刺激T淋巴细胞分泌TNF-β。TNF-α前体由233个氨基酸残基组成，含76个氨基酸残基的信号肽，切除信号肽后成熟型TNF-α为157氨基酸残基，分子量为17 000，小鼠TNF-α前体为235氨基酸残基，含79个氨基酸残基信号肽，成熟型TNF-α为156氨基酸残基，分子量也为17 000；人TNF-α与小鼠TNF-α有79%氨基酸的同源性。人TNF-β是由205个氨基酸残基组成，成熟型为171个氨基酸残基，分子量为25 000。鼠TNF-β由202个氨基酸残基组成，成熟型为169个氨基酸残基，与人TNF-β有79%的同源性。

二、TNF受体

TNF受体也是一种糖蛋白，是TNF直接作用于细胞的位点，是其生物学作用的基础。主要分布于肝、肾、肺、皮肤、胃肠道和心血管系统，其数目因组织细胞不同而有所差异。一些细胞，特别是人的单核细胞有TNF的两个结合位点，亲和力有高低之分，其中低亲和力受体在数量上远多于高亲和力受体。虽然细胞的TNF受体数目和种类不同，但细胞对TNF细胞敏感性并不取决于受体数目。

TNF受体可分为两型：Ⅰ型和Ⅱ型。两型受体均包括胞膜外区、穿膜区和胞浆区三个部分。TNF-α和TNF-β的受体可能是同一的，它们均与同一TNF受体结合，生物学作用相似，但两分子的编码基因不同，组织中检测到的多是TNF-α。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

三、TNF的生物学作用

1. 抗肿瘤和免疫调节作用

TNF在体外可杀伤培养的肿瘤细胞，在体内可引起肿瘤出血和坏死。目前，对它杀伤肿瘤的机理还不十分清楚。TNF的抗肿瘤作用可能与以下因素有关：

(1)可能它与相应受体结合后，改变靶细胞糖代谢，使细胞内pH降低，导致细胞死亡。

(2)通过TNF对机体免疫功能的调节作用，促进T细胞及其他杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤。

(3)TNF作用于血管内皮细胞，损伤内皮细胞或导致血管功能紊乱，使血管损伤和血栓形成，阻断肿瘤组织的局部血流而发生出血和缺氧坏死等。TNF除对多种肿瘤细胞具有直接杀伤作用外，并可显著提高机体对外部刺激的免疫功能。

单核-巨噬细胞和淋巴细胞的聚集和活化是机体组织损伤时细胞反应的一个显著标志，TNF可通过调节这些细胞功能活动来调节机体或局部组织的免疫力。例如：①TNF可刺激单核-巨噬细胞前体细胞分化；②激活T淋巴细胞、诱导IL-1、IL-2、IL-6、IL-8等白细胞产生，并促进IL-2受体和主要组织相容性复合物(MHC)Ⅰ类和Ⅱ类抗原的表达；③增强有丝分裂原和外来抗原刺激B细胞的增殖和Ig分泌；④通过诱生干扰素、CSF等多种细胞因子调节免疫细胞活性，增强机体免疫防护能力。

2. TNF是介导炎症反应的重要炎症因子之一

在炎症过程中，TNF通过对循环细胞特别是中性粒细胞

和血管内皮细胞的多方面作用，造成机体许多病理、生理方面的影响：

(1)创伤后，局部的血管内皮细胞经 TNF 刺激，引起形态和功能上的变化，使通透性增强，加重局部组织炎性水肿和炎性细胞浸润。

(2)创伤局部产生的 TNF 能吸引单核-巨噬细胞、淋巴细胞至损伤部位，并刺激这些细胞释放更多的炎性调节因子，如 IL-1，PGEα 等，以及增加这些细胞的细胞毒性作用。

(3)TNF 对多形核白细胞(PMNs)具有趋化作用和多种影响，包括诱导其脱颗粒，释放溶酶体；增加 PMNs 凝集作用；促进其粘附于血管内皮细胞；诱导产生超氧化物阴离子(O_2^-)；增强 PMN 的吞噬作用和细胞毒作用等，其中，TNF 促进 PMNs 粘附于血管内皮细胞的作用被认为是 PMN 诱导内皮细胞损害的先决条件。

TNF 对机体造成的许多病理生理方面的影响都可归结于其对血管内皮细胞和中性白细胞的作用，它可通过各种途径造成血管内皮细胞损伤出现微血栓，引起血管调节障碍，导致组织损伤。

TNF 是通过对炎性细胞聚集和活化作用的影响调节创伤炎症反应过程的。

3. 调节创伤愈合

创伤组织修复是一个复杂的协调过程，与创伤局部微环境密切相关。创伤局部产生的 TNF 可调节创伤愈合，其调节的因素可能有：

(1)TNF 对内皮细胞的趋化作用，诱导胶原形成毛细血管样结构。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

(2)TNF的直接血管生成作用。

(3)TNF刺激纤维母细胞的复制,促进成纤维细胞增殖和分泌胶原酶等,从而局限组织损害和促进创伤组织的修复和改建。实验证实,在正常和损伤动物局部应用TNF-α后,伤口抗张强度(Wound breaking strength)增加,说明TNF可以调节创伤的愈合。

但是,TNF作用于不同细胞并与受体特异性结合后产生的生物学效应主要表现为促进细胞生长和抑制细胞生长的双重作用,TNF可刺激人二倍体成纤维细胞复制,提高牛的内皮细胞趋化性,高浓度的TNF可抑制内皮细胞增殖,甚至产生杀伤细胞效应。为此,在获得大量TNF促进创伤组织修复资料的同时,也有部分实验得出的结论与之相反。

例如,TNF可抑制胶原和纤维粘连蛋白合成和创伤炎症期肉芽组织的形成。

Solomon等(1991)认为TNF-α可降低伤口抗张强度和胶原基因的活性,局部应用TNF治疗对创伤愈合不利。Steenfos等(1989)认为应用TNF并不能改善创伤愈合过程。

Fajardo等(1992)认为TNF对新微血管的生成具有双重作用,主要取决于它在局部组织中的浓度,低浓度时诱导血管生成,而高浓度时则抑制血管生成等。

由此看来,TNF对创伤作用的研究结果是相当矛盾的,实验结论往往不能完全反映实际条件下创伤愈合中TNF的作用。因此,有关TNF对组织修复的报告应考虑以下几点:①不同实验者实验条件的差异;②作用的细胞种类以及使用的TNF浓度不同;③不同的给药途径可引起不同的结果。

目前,人们对TNF在组织损伤修复中的作用尚不大清

楚，仍在探讨和研究之中。

4. TNF 在应用方面的注意事项

(1)TNF 促进创伤修复作用与所采用的载体有关。在 PBS 液中，TNF 很快被降解，而在胶原和白蛋白液中可缓慢释放，以利在局部创面形成高浓度 TNF 而发挥作用。

(2)TNF 在创伤修复中是一种局部介质，局部给予 TNF 能促进创伤修复，而全身应用则无直接作用。

(3)低浓度下的 TNF 能促进创伤修复，较高浓度时这一促进作用可能转为抑制。因此，选择适当的浓度对 TNF 的生物学活性十分必要。

(4)TNF 本身与其他因子之间具有相互促进或拮抗作用，因此，合理配伍也十分重要。

TNF 对创伤修复中肉芽组织的基质增生、毛细血管形成及上皮覆盖等过程均有明显作用。Steenfors 将不同浓度的 TNF 作用于鼠背部创伤模型，检测肉芽组织中总蛋白、DNA 和羟脯氨酸含量，发现 TNF 在低浓度时有促进修复作用，高浓度时有抑制组织修复作用。如果将 TNF 与 PDGF 使用，上述指标均下降。由此看来，TNF 与其他细胞因子作用可能具有协同效应或拮抗效应。TNF 是一种多功能调节因子，可作用于多种组织细胞，发挥多种生物调节作用，在免疫反应、炎症反应方面及提高正常组织内环境稳定的调节能力方面均起重要作用。现已证实，TNF 调节多种细胞和细胞的代谢与功能活动主要是通过自分泌和旁分泌的局部分泌方式，作用于细胞膜上的 TNF 受体而发挥生物效应的。

5. TNF 生物学作用的多样性

(1)TNF 受体存在于几乎所有被检细胞，如巨噬细胞、淋

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

巴细胞、多形核白细胞、成纤维细胞、内皮细胞等。

(2)TNF 活动可导致多种信号传递旁路、激酶和转录因子。

(3)TNF 活动可导致许多基因的活化。

不同细胞表面 TNF 受体数目和亲和力有很大差异，并且细胞表面受体数目与该细胞对 TNF 的敏感性不呈平行关系，平均每个细胞有 103～104 个 TNF 受体。TNF 活动大多通过与其受体结合而介导，因此，对 TNF 受体的研究无疑对阐明 TNF 在炎症和修复过程中的作用有重要意义。

四、TNF 在牙髓尖周病中的作用

在牙髓组织的创伤、炎症和修复过程中，TNF 的生物学功能也起重要作用。其中，TNF 诱发炎症反应和具有刺激某些正常细胞生长的生理功能也许是重要环节。

在感染病变过程中，内毒素和 TNF 的关系十分密切，LPS 可诱导 TNF 产生，而 TNF 又介导内毒素的生物学效应，许多研究证明，LPS 的许多生物学效应并不是直接的，而是通过 TNF 和 IL-1 实现的。因此，在牙髓尖周病的发病机制中，由内毒素诱生的 TNF 和 IL-1 可能是炎症过程中重要始动机制。

Kamran 用 ELISA 方法检测了感染根管中的 TNF，发现根管渗出液中 TNF 的含量为 124～4 900ng/ml。在尖周炎渗出期，TNF 活性相当高。LPS 可通过与靶细胞作用诱导 TNF-α 细胞因子合成和分泌。这些靶细胞包括单核-巨噬细胞、B 淋巴细胞、粒细胞、血小板、成纤维细胞和内皮细胞等。其中单核-巨噬细胞是 LPS 作用的主要靶细胞。最近研究证

实，以具核梭杆菌(Fn)、产黑色素类杆菌(Bm)为代表的感染根管优势致病菌 LPS 在有血清的条件下，能诱导单核细胞产生较高浓度的 TNF-α、IL-6、IL-8 等细胞因子，在缺乏血清时诱导能力下降，Fn、Bm 等细菌 LPS 诱导单核细胞分泌细胞因子的过程中依赖血清和细菌表面受体 CD_{14}，抗 CD_{14} 抗体在血清的协同下能阻断低浓度(10ng/ml 以下)LPS 诱导单核细胞产生细胞因子。

CD_{14} 是细胞膜蛋白家族成员之一，是一种分子量为 54 000 的糖蛋白，以糖基磷脂酰肌醇(Glycosyl phosphatidy linositol, GPI)锚附于细胞膜表面。GPI 上的蛋白称为锚蛋白，CD_{14} 也属于 GPI 蛋白。研究表明，单核细胞、巨噬细胞能表达 CD_{14}，而未激活的粒细胞、T 细胞、B 细胞不表达 CD_{14}。CD_{14} 不仅存在于膜表面，还可作为可溶性分子自膜表面游离至血清或体外培养的单核细胞上清液中。在 LPS 诱导单核细胞应答的实验中，抗 CD_{14} 抗体能够阻断内毒素脂多糖-内毒素脂多糖结合蛋白(LPS-LBP)与单核细胞膜表面的结合，从而抑制 TNF-α 细胞因子的产生。

采用组织形态学和免疫组化研究表明，在内毒素血症致牙髓组织病理学改变中，牙髓组织不仅出现血管扩张，充血，炎细胞着边、浸润和广泛微血栓形成等现象，而且发现 TNF 广泛分布于牙髓组织和牙周组织的血管内皮细胞中，对照组和抗体保护则未见 TNF 的出现。说明，内毒素血症时出现的弥漫性血管内凝血或微血栓为特征的组织损伤中，TNF 的作用更具重要意义。

研究还表明，大鼠磨牙正常牙髓组织中有 TNF-α 阳性细胞的表达，大鼠内毒素性炎症牙髓中也有 TNF-α 的表达，且

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

参与了早期的炎症反应过程。牙髓组织中的 TNF-α 阳性细胞主要是单核-巨噬细胞、中性白细胞和血管内皮细胞。

第四节 血小板衍生的生长因子(PDGF)

血小板衍生的生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)作为一种普遍存在的促有丝分裂剂,最初由于它对培养于全血清中的间充质细胞的促分裂活性而被发现。迄今为止,PDGF 的理化性质、生物学活性、作用机制和创伤修复中的重要作用等方面的研究均取得了很大进展,受到医学界的瞩目。

1971 年 Balk 首先观察到正常鸡胚的成纤维细胞在经热处理(56℃, 30min)的血浆培养基中,细胞则出现很快分化与增殖的现象。据此,Balk 推测,有某种能刺激细胞增殖的致丝裂因子在血液凝固过程中从血小板里释放出来,或从血浆前体物质中转化而来,并且这种致丝裂因子作为一种"损伤激素"能在组织损伤部位引起细胞的增殖。1974 年,Ross、Kohler 等分别证实了一种血小板的提取物能够在体外促进猴动脉平滑肌细胞和鼠的 $3T_3$ 细胞增生。可见,上述促细胞增殖的活性物质就是在凝血过程中从血小板释放的 PDGF。由于 PDGF 在创伤愈合过程中起重要作用,故又被人们称之为"创伤因子",其作用受到人们越来越大的关注。

一、PDGF 的存在方式和来源

近十多年来,人们成功地从人、猪、羊中分离到 PDGF,而最早是从人血小板中提取的。人的 PDGF 是一种多肽、糖蛋

白，分子量为 28 000～35 000。每种 PDGF 分子含 16 个半胱氨酸残基，活性 PDGF 是由 A、B 两条不同的链通过二硫链连接的。Deuel 等证实，PDGF 在体内有两种形式，即 PDGF Ⅰ 和 PDGF Ⅱ。两者在氨基酸以及糖类的组成上虽然有所不同，但其致丝裂活性相似。Harlan 等认为，PDGF 在体内存在的方式，一是以无活性的前体存在于细胞内；另一种方式则是以活性的方式结合于产生 PDGF 的细胞膜上，这种方式与白细胞介素-1 的分泌有些类似。正常人体内的 PDGF 水平几乎检测不出，而通过静脉注入狒狒体内的 PDGF 的半量清除时间也只有 2min。因此，全身结缔组织细胞与 PDGF 的反应可能不是依靠循环中的 PDGF 来发挥作用的，而是 PDGF 的局部合成与分泌效应。

研究已证实，体内能合成与分泌 PDGF 的部位除血小板以外，激活的巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞等在调节 PDGF 基因转录因子的控制下均能产生 PDGF。故 Ross（1989）将 PDGF 的来源分为循环细胞产生的、固定细胞产生的以及转化细胞产生的三种类型。但总的来讲，在与创伤修复关系中，以人血小板的 PDGF 与重组的 BB 型的 PDGF 研究最多。

二、PDGF 的受体

PDGF 的许多生物学效应是通过靶细胞膜上存在的特异性受体而得以实现的。PDGF 受体有 A 型和 B 型，其中 A 型能与所有的 PDGF 分子结合，而 B 型受体仅与 PDGF-BB 相结合。

深入研究表明，每种受体又是由 α 和 β 两个亚基以一定

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

方式构成的，其中α亚基能与PDGF的A链和B链结合，β亚基只能与B链结合。因此，PDGF-BB能与三种形式受体(αα，αβ，ββ)结合，PDGF-AA则只能与αα形式受体结合，而PDGF-AB既能与αα受体结合又能与αβ受体结合。PDGF受体亚基模型以及不同形式PDGF与其亲合的情况：

(1)受体亚基：PDGF受体亚基存在两种类型，即α亚基和β亚基。α亚基可结合PDGF A链和B链；β亚基只结合B链。在配基结合之前，PDGF受体亚基以独立的单体存在于细胞表面或松散地联成二聚体。

(2)受体类型：两个亚基能形成3种类型的高亲和力PDGF受体，即αα，αβ，ββ受体。

(3)受体结合：PDGF-AA只能结合到PDGFαα受体上，而PDGF-AB即能结合PDGFαα受体也能结合αβ受体；PDGF-BB能结合到所有3种类型PDGF受体。

PDGF受体主要存在于间充质细胞，包括成纤维细胞、成骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞和微血管内皮细胞等。

三、PDGF的生物学功能

(1)对细胞的趋化作用。

(2)对细胞生长的直接和间接作用。

(3)对细胞基质成分的调节作用等。例如PDGF对结缔组织如成纤维细胞、平滑肌细胞的趋化性可使细胞向创伤部位迁移，并在那里刺激细胞增殖，这在创伤修复中起着关键作用。

四、PDGF 在创伤修复中的作用

PDGF 与创伤修复的关系十分密切，它能直接或间接地参与炎症反应、细胞增殖等组织修复的全过程。

当组织发生损伤时释放 PDGF，对中性白细胞、单核细胞、成纤维细胞以及平滑肌细胞等发生趋化作用，吸引这些细胞向受损部位迁移。这一过程是通过 PDGF 作用于靶细胞后使磷脂酰肌醇转变，释放出花生四烯酸，引起前列腺素类物质增加而产生的。释放的 PDGF 的另一大特征是促进成纤维细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞的有丝分裂，使细胞由 G_1、G_0 的静止期进入到细胞周期的增殖期，促进 V 型胶原合成，增加胶原酶的释放，刺激伤口生长，促进伤口愈合。

采用酸醇抽提、离子交换吸附和凝胶层析方法，从新鲜牛血小板中提取了 bPDGF，纯化倍数提高至 7 850 倍，收取率为 3%。bPDGF 可促进处于静止状态的 $3T_3$ 细胞 DNA 合成增加。bPDGF 是一种阴离子多肽，耐热(100℃)，耐酸(pH2.5)及耐受 2%SDS 的作用，具有良好的体内活性，可以促进伤口处肉芽组织生长、上皮再生，使动物创伤伤口加速愈合。

五、PDGF 对牙髓、牙周成纤维细胞的作用

PDGF 可以诱导许多细胞在不同时间产生多样的生物学效应，尤其是诱导细胞的定向迁移和直接、间接的细胞增殖作用，常常与结缔组织的形成有关。因此，PDGF 的作用引起了口腔医学的重视。Blom(1994)、Matsuda(1992)等研究发现 PDGF 能刺激牙周膜成纤维细胞的有丝分裂，人基因重组的 PDGF 或人血小板纯化的 PDGF 均可诱导人牙髓成纤维细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

胞，牙周膜和牙龈成纤维细胞的DNA合成增加。在近期进行的PDGF对牙髓、牙周组织细胞生物学作用方面的研究表明，20～60ng/ml bPDGF可明显促进体外培养人牙髓、牙周膜成纤维细胞的DNA合成，40ng/ml bPDGF使人牙髓成纤维细胞DNA合成在36h时达最高峰，使人牙周膜成纤维细胞DNA合成在24h时达最大值，bPDGF对体外培养人牙髓，牙周膜成纤维细胞胶原蛋白合成无明显促进作用。

人牙周膜成纤维细胞在bPDGF作用下其超微结构发生核酸、蛋白质合成有关的变化，显示出细胞DNA、RNA蛋白合成旺盛，代谢、增殖活跃。正常牙髓组织中的牙髓细胞、微血管内皮细胞表达PDGFβ受体，提示这两种细胞是PDGF的靶细胞，PDGF可能在牙髓组织的生长、发育等正常生理过程与创伤过程中起重要作用。

在尖周肉芽组织中的成纤维细胞、毛细血管内皮细胞有PDGFβ受体表达。表明PDGF有可能刺激成纤维细胞，毛细血管内皮细胞产生生物学效应，在尖周病的修复中发挥作用。

在尖周肉芽组织中的浆细胞、巨噬细胞可表达PDGFβ受体，推测作为靶细胞的浆细胞、巨噬细胞在PDGF作用下参与了慢性尖周病变的免疫病理过程等。

第五节　表皮生长因子(EGF)

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)是Cohen继神经生长因子(NGF)研究之后偶然发现的。1959年，Cohen在研究神经生长因子时发现，给新生小鼠注射含有NGF的唾液提取物后，新生小鼠眼睑早开，门齿早萌。1962

年，他分离出这种活性物质，因这种物质能刺激表皮的生长和角化，故取名为EGF。一年以后，阐明了它的一级结构，成为最早明确结构的生长因子。而后，对EGF的组成进一步研究表明，EGF是一种由53个氨基酸残基组成的单链，分子量6 050，等电点4.6，含3个二硫链。EGF是一种生物学效应相当广泛的多肽生长因子。随着研究工作的深入，以后人们又对EGF在动物体内的来源、受体分布、生物学活性等进行深入研究，取得了巨大成果。

一、EGF的产生

EGF的主要来源和贮存于颌下腺。它由颌下腺导管系统的颗粒曲管细胞产生，经导管进入口腔，成为唾液成分。唾液中的EGF吞咽后经胃肠道吸收再进入血液。此外，人体小肠的Brners腺、幽门腺、胃底腺和肾脏等也可分泌EGF。它还见于正常生理状态下的所有体液中，如唾液、胃液、尿液、乳汁、胆汁等。EGF在体液中的含量较高，血浆含量较低。小鼠的EGF称mEGF，人的EGF称hEGF ，人EGF的物理、化学、生物活性与鼠EGF非常相似。EGF亦有前体，是一种具有受体功能的膜蛋白，在EGF结合蛋白等因素作用下，组织中的EGF前体降解为EGF。EGF对热不敏感，不被胰蛋白酶、木瓜酶消化，这对稳定结构，发挥其生物学作用是十分重要的。正常情况下，人和鼠血浆中EGF浓度很低，小于1ng/ml，但在注射肾上腺素60min后，血浆中EGF可以从1～2ng/ml上升到150ng/ml，同时颌下腺中的EGF浓度都下降50%。EGF在小鼠体内的分布与人有所不同，小鼠唾液中的EGF含量比人高500倍，血浆中的EGF含量比人高10倍。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

二、EGF 的受体

使用^{125}I 标记的鼠 EGF 为探针，已在多种哺乳动物的组织或培养的细胞膜上检测出 EGF 受体。EGF 受体是一种糖蛋白，分子量约 150 000～170 000。EGF 受体在体内广泛存在，来自内、中、外三个胚层的细胞都有分布，如角膜细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮癌细胞、绒毛膜上皮癌细胞等。由于 EGF 受体可分布在三个胚层的组织和细胞中，因此，所含受体的类型和数目便因细胞类型和生长状态不同而有所差异。依据功能的不同，至少有 3 种类型的 EGF 受体：①能与 EGF 结合并能引起效应的受体；②能与 EGF 结合但不能引起效应的受体；③既不能与 EGF 结合也不能介导 EGF 效应的改变了的受体。其中，参与 EGF 结合的受体还可分为两大类，即高亲和性受体和低亲和性受体，前者仅占总数的 0.1%～10%，但其分子量值比后者小 1～2 个数量级。

EGF 的生物学活性是通过与靶细胞的受体作用后而发挥的，其过程包括结合、内吞、溶解和受体再循环利用等过程。EGF 与受体特异性结合后形成 EGF 受体复合物，继而在细胞膜上形成被膜小泡，最终与溶酶体融合而降解，这就是 EGF 的内化过程。EGF 与膜中的受体特异性结合后，可能引起受体构象的改变，引起质膜或胞内酪氨酸残基特异性的蛋白激酶从无活性形式转化为活性状态，对作用物酪氨酸进行特异性磷酸化，从而启动刺激细胞增生信号的途径。

三、EGF 的生物学效应

EGF 的生物学效应非常广泛（表 5-1），是一种强有力的

细胞分裂促进因子，能促进体内、外多种细胞的分化和增殖，包括启动 DNA 的合成，激活 RNA 和蛋白质合成，增加细胞大分子如糖蛋白和氨基多糖的合成。体外培养中，EGF 可显著促进^{3}H-TdR 进入组织修复细胞，主要为成纤维细胞，进而促进细胞分化与增殖，其最大促进作用发生在细胞培养的第 5～7 天。

表 5-1　EGF 诱导的生物学效应

EGF 诱导	生物学效应
整体水平	(1)加速皮肤组织、角膜上皮组织、肺和气管上皮的增殖与分化
	(2)强化甲基胆蒽的致癌作用
	(3)抑制胃酸分泌
	(4)提高鸟氨酸脱羧酸活性，尸胺积累
	(5)增加皮肤内二硫键成分
	(6)促进肝肥大与增生，脂肪肝形成
	(7)诱发腭裂
	(8)促进牙齿早萌以及眼睑睁开
器官培养	(1)加强皮肤组织、角膜上皮组织、乳腺上皮细胞的增殖与分化
	(2)增加 RNA 与蛋白质合成
	(3)提高鸟氨酸脱羧酶活性，尸胺积累
	(4)抑制腭板的融合
细胞培养	(1)增加 K^+、脱氧葡萄糖、α-氨基异丁酸盐的运输
	(2)激活糖酵解
	(3)刺激大分子合成(如透明质酸、RNA、DNA、蛋白质)
	(4)增加细胞增殖，改变膜的性质
	(5)促进角膜细胞角质成分产生
	(6)刺激与促进绒毛膜促性腺激素分泌
	(7)增加前列腺素的生物合成

EGF 可加快钙内流和磷脂酰肌醇代谢，从而促进 4,5-

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

二磷酸磷脂酰肌醇转变为甘油二酯和三磷酸肌醇，后两者是新发现的第二信使，能控制细胞的分泌、代谢、增殖等过程。

EGF可促进花生四烯酸代谢和前列腺素合成，影响骨和钙磷代谢。

EGF还具有免疫抑制作用，可抑制免疫系统的功能和迟发型过敏反应。T_H是EGF导致免疫抑制的靶细胞。

纯化的EGF可使胸腺、脾和骨髓中的DNA合成下降，而使其他组织中的DNA含量增加。

四、EGF对组织修复的影响

组织损伤之后，首先发生的是局部创面炎症反应，各种炎症细胞包括MΦ、中性粒细胞、单核细胞和部分修复细胞等在早期均向伤口聚集，在这一过程中，EGF起着趋化和调节的作用，促使各种炎症细胞和组织修复细胞在损伤部位聚集。EGF参与炎症的更主要的作用在于它能激活磷脂酶A_2活性，从而促进上皮细胞释放花生四烯酸，通过调节环氧化酶与脂氧化酶的活性或含量影响前列腺素的合成。近来的资料表明，EGF还可通过促小分子物质的跨膜运动增强透明质酸的合成或活性以及增加肉芽组织中的血流量来调节炎症反应的强度。

在组织的修复中，EGF可对整个肉芽组织中的纤维与基质的沉积起主导作用，而其他生长因子则可能只参与组织修复中某一阶段的反应，其作用无法与EGF相比。Linllia(1990)认为，EGF及其受体调节伤口愈合过程包括上皮再生、新血管化、细胞外基质的合成和改建，以及通过对其他生长因子的影响而促进创伤愈合。

EGF对修复细胞的作用是通过与受体结合而发挥的。哺乳动物细胞上都存在EGF受体,其中以上皮细胞最为丰富,成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞上也存在很多EGF受体。体外细胞培养中,EGF能刺激有EGF受体的细胞生长。在创面愈合过程中受EGF影响的主要细胞有上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞。EGF是成纤维细胞的化学趋化剂,可吸引成纤维细胞到损伤部位,并促进它的有丝分裂和胶原合成等功能,与创面愈合直接相关。EGF也是血管生成因子,培养的微血管的内皮细胞有EGF受体表达,体外实验证实EGF可刺激内皮细胞DNA合成,并促进内皮细胞的迁移和增殖,以及诱导人微血管内皮细胞形成血管样结构等。

基于对EGF在组织或细胞修复作用中的认识,有人应用EGF促进创面愈合。动物实验表明,大鼠皮下植入海绵中放入稳定释放EGF的小药丸,观察到肉芽组织增多,DNA合成成倍增加,蛋白含量增加33%,组织湿重增加。含EGF羊毛脂应用于猪浅度烧伤的皮肤创面,能加快上皮再生的速度,促进创面愈合。猪的中厚层皮肤伤口中局部应用rhEGF,也能促进创面愈合。大量实验证实,外源性应用EGF对各类创伤模型的愈合均有效。临床应用表明,EGF确实起到加速伤口愈合的作用。Brown对9例难愈的慢性创面局部应用EGF,8例完全治愈。有学者观察了EGF对火器伤的治疗作用,发现应用EGF组在伤后不同时间比对照组伤口细胞增殖更活跃,数量更多,细胞分泌合成更旺盛,胶原形成更明显。目前,由于产生了基因重组EGF,使临床上进一步扩大应用成为可能。

关于EGF促进组织修复的机制,有学者认为,EGF的作

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

用是一种非特异性的，可能是通过增加胶原生成细胞的数量，或直接刺激组织修复细胞内DNA、RNA、蛋白质及细胞外大分子的合成等而实现。从氨基己糖在肉芽组织中的增多来看，EGF可能促进了羟脯氨酸在修复组织的沉积而加速愈合。EGF的作用也受到其他生长因子的协同和拮抗作用的影响，如EGF受体的活性能被PDGF等多种因子的控制，EGF通过成纤维细胞可增加细胞外基质葡聚糖合成，但在TGF-β存在的情况下可抑制胶原合成。

五、EGF对牙髓细胞的作用

牙髓细胞是一种具有成纤维细胞特性的多潜能细胞。牙髓损伤后，牙髓细胞的再生潜能是牙髓修复的生物学基础。EGF是否对牙髓细胞具有增殖作用，最近有人采用人工基因重组型EGF和^{3}H-TdR、^{3}H-Pro细胞内掺入技术，观察EGF对人牙髓成纤维细胞(HPF)DNA合成及EGF-HAP复合物对HPF生长及附着的影响等，结果发现EGF能够显著地促进HPF的DNA合成，EGF在一定的浓度范围和作用时间内，对HPF DNA合成的刺激作用具有剂量和时间依赖效应，EGF对HPF的蛋白质合成也具有明显的促进作用，EGF-HAP可使HPF呈复层和密集的放射状生长等。EGF可调节牙髓细胞的活性。对牙胚的研究发现，在成釉器发生时期，内、外釉上皮表达EGF受体，随着生长分化，星网状层也出现丰富的EGF受体。又有人发现，EGF对体外培养的鼠帽状期牙胚星网层的形态有重要影响。外源性EGF可以刺激培养的牙胚的生长进程等，由此可见，EGF对牙齿的发育起了重要作用。

最近，在对牙髓炎症及修复过程中几种生长因子的分布与变化的研究中发现，EGF 在牙髓组织中的分布是随修复反应的变化而变化的。修复反应中期，组织中含量最为丰富，修复反应的早期和后期其含量有所减少。这可能因为组织损伤的早期，细胞对创伤刺激的反应较弱，而中期是组织修复反应的旺盛阶段，此时丰富的生长因子有助于细胞的增殖分化和基质合成，以促进修复反应的进程。后期，牙髓修复已趋完善，通过自我调节，EGF 等和 TGF-β 等生长因子的合成分泌逐渐减少，从而有助于避免组织的过度增殖，这是机体的正常生理调节现象。该研究推测，EGF 在牙髓组织中的另一个作用是通过刺激牙髓细胞的增殖和基质分泌而促进修复性牙本质的形成。

总之，EGF 可促进细胞的分化和增殖，可促进组织修复，但在动物实验和临床应用 EGF 等生长因子时，需要解决的一大问题是，如何使生长因子能较长时间地保持其生物学活性和刺激组织的再生反应。有报道说，采用甲基纤维素化的 EGF 或与甲基纤维素化的胶原相交联的方法基本解决了这一难题。目前，在细胞培养和动物实验已取得肯定成果的基础上，国外已有学者开始将 EGF 应用于临床。至于 EGF 在牙髓创伤修复中的应用尚有待于进一步研究。

第六节　转化生长因子-β(TGF-β)

转化生长因子-β(Transforming growth factor-β, TGF-β) 是一组调节细胞生长和分化的超基因家族，现已证实属于这一家族的成员包括转化生长因子-β1～5，骨形成蛋白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

(Bone morphogenetic proteins，BMP2～13)、活化素(Activins)、抑制素(Inhibins)、苗勒抑制物质(Mullerian inhibitor substance，MIS)等。TGF-β的命名是根据这种细胞因子能使正常的成纤维细胞的表型发生转化而确定的，即在表皮生长因子(EGF)同时存在的条件下，改变成纤维细胞贴壁生长特性而获得在琼脂中生长的能为，并失去生长中密度依赖的抑制作用。TGF 有 3 种类型，即 TGF-α、TGF-β 和 TGF-γ，其中与胚胎发育、形态发生、细胞分化、组织增生以及在炎症修复过程中起重要作用的主要是 TGF-β。TGF-β 最初是由 Delarco(1978)在小鼠纤维细胞的无血清培养上清液中分离得到的。以后 Roberes 等从肿瘤细胞、胎儿生殖器组织细胞和许多正常组织细胞培养上清液中也分离出 TGF- β。而后，TGF-β 从人血小板、人胚胎、牛肾中提纯出来，目前已经获得人 TGF-β1～3 及 BMP 2～ 13 的相应 cDNA 克隆，并在原核和真核细胞中进行表达和表达产物的纯化。

一、TGF-β 的产生

TGF-β 由多种正常细胞和组织，如单核细胞、中性粒细胞、成骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等产生，其中血小板和骨组织中的 TGF-β 最为丰富，血小板中的含量是其他正常组织的 10～100 倍。此外，TGF-β 还存在于循环血液或损伤修复、炎症反应的局部组织内。许多转移的细胞，如星形细胞瘤、神经胶质瘤、人结肠癌和乳腺癌细胞等也可产生。

哺乳动物组织中的 TGF-β 目前已鉴定出四个亚型，即 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 和 TGF-β1β2。TGF-β1 在体细胞系中所占比例最高(＞90%)，活性最强，成为研究的主要对

象。成熟型TGF-β为一同源双体肽，分子量为25 000，由两条相同的12 500分子量的亚单位肽链通过二硫键连结而成，每条单体肽链含112个氨基酸。细胞初期合成的TGF-β为一大分子量的非活化型前体，经加工处理后方产生分子量12 500的单体。

人、牛、猪TGF-β的氨基酸序列完全相同，人与鼠的TGF-β仅一位氨基酸残基不同，其同源性高达99%，表明在进化过程中，TGF-β氨基酸序列得以高度保留。在不同种属中，TGF-β的同源性相当高。

组织细胞分泌的和重组表达的TGF-β都是由无活性的前体形式存在。TGF-β前体复合物必须活化才有显著的生物学活性，其体外活化方法有：①pH＜3.5或pH＞12.5；②加热至90℃，5min；③加入增溶剂SDS(0.02%)或脲8mol/L；④加入纤溶酶，体外活化方法在体内不大可能实现。前体复合物在体内的活化可能通过局部区域释放蛋白水解酶或特异活化因子引起该复合物水解或解离。对TGF-β前体活化调控格外重要，因前体复合物有较长的半衰期，在循环系统内可以维持较长时间不被分解，有充分条件到达靶细胞。通过形成TGF-β前体复合物，可以限制TGF-β活性，防止不必要的效应产生。

二、TGF-β的受体

TGF-β的多功能生物学作用均由其相应的受体所介导，因此，TGF-β受体日益受到关注，近年的有关研究已取得很大进展。TGF-β是一种存在于细胞表面的跨膜蛋白，广泛存在于正常细胞和肿瘤细胞表面，完全检测不到TGF-β受体的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

情况很少见，仅人视网膜母细胞瘤细胞系中缺乏 TGF-β 受体。每一细胞拥有的受体数目在 600～8 000 个，静止细胞的受体亲和力较生长细胞明显下降。最近发现 TGF-β 受体存在着三种不同的形式，它们的分子量分别为 53 000、70 000～85 000 和 250 000～350 000（Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ型）。Ⅰ、Ⅱ型 TGF-β 受体均为糖蛋白，它们和 TGF-β1 的亲和力要比和 TGF-β2 的亲和力大 10～80 倍，Ⅲ型受体是一种蛋白聚糖(Proteoglycan)，它与 TGF-β1 和 TGF-β3 的亲和力相似，是 TGF-β 的主要结构形式，可能在 TGF-β 发挥生物学功能中起着重要作用。一般细胞均能表达三种受体，但受体数目分布依动物种系、细胞类型和培养条件的不同而不同。静止细胞的受体亲和力较生长细胞有明显下降。TGF-β 在进化过程中具有高度同源性，TGF-β 受体在各种细胞中的普遍存在，表明 TGF-β 及其受体较其他生长因子在细胞生理过程中有着更重要的作用，同时表明对 TGF-β 的反应是细胞生存的基础。

三、TGF-β 的生物学功能

TGF-β 的生物学功能十分广泛，主要功能是调节细胞生长和分化，调控细胞外基质蛋白的形成。它对不同细胞的生长作用不同，对某些细胞，如上皮细胞的生长起抑制作用；对有些细胞，如间充质细胞或中胚层源细胞的生长起双向调节作用。TGF-β 对不同类型细胞的分化也表现为促进和(或)抑制的双重作用，TGF-β 可以以不同的作用方式增加细胞外基质的含量，也可阻止已合成的细胞外基质的降解，包括降低基质蛋白降解酶的合成和增加基质蛋白降解酶抑制物的合成等两种作用。

正常细胞大多分泌非活性 TGF-β,机体依据生理功能的需求,激活和调控 TGF-β 的生物学作用。TGF-β 对各种细胞的作用很复杂,其主要表现是:

1. 促进和(或)抑制细胞的增殖和增生

在细胞的增殖和增生中,一方面它能促进成纤维细胞、成骨细胞和雪旺细胞的生长,另一方面它能抑制上皮细胞、角化细胞、内皮细胞、肝细胞、肠和支气管上皮细胞及其 T、B 淋巴细胞增殖,抑制再生肝细胞的合成。尽管 TGF-β 抗细胞增殖作用的机理目前尚不十分清楚,但可以肯定与 PDGF 和 EGF 的作用途径完全不同。TGF- β 抑制细胞增殖的效应可能与其拮抗其他肽类生长因子的促细胞分裂作用有关。

有研究表明,在正常情况下,肝组织中的内皮细胞及肝上皮细胞可以产生 TGF-β。当肝部分切除而肝细胞再生后,肝内尤其是富含内皮细胞的非实质区,TGF-β 的 mRNA 含量显著增多,这说明肝组织修复时,非实质区内皮细胞等细胞的 TGF-β 增多,产生的 TGF-β 反过来又对肝细胞、内皮细胞的生长产生反馈性抑制作用(旁分泌抑制作用),以防止肝细胞的无限生长。而内皮细胞本身又受自产的 TGF-β 抑制(自分泌抑制),进一步防止了产生过多的 TGF-β。这种反馈性的抑制作用说明 TGF-β 受体信号能够做为细胞进一步复制的调节信号,选择性地降低促增生基因的表达而发挥其细胞生长抑制作用,这一作用很可能是通过对其他肽类因子促进增殖信号的阻抑作用来完成的。

2. 促进细胞外基质形成

细胞外基质(ECM)是组织细胞形态发生、生长、分化的重要调节因子,ECM 控制着细胞的迁移、增殖、分化、代谢和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

功能，而 TGF-β 可以以不同方式增加多种 ECM 的含量及促进细胞外基质(ECM)，如胶原蛋白、纤维粘连蛋白的表达和抑制。TGF-β 对细胞外基质的调节作用，是通过降低基质蛋白降解酶的合成以及增加基质蛋白降解酶抑制物的合成两种作用来完成的。从而通过促进基质合成增加，减少已合成基质分解两个途径，使细胞外基质大大增加，显然这对细胞的形态发生、增殖和分化过程起着重要作用，有利于胚胎发育和组织细胞修复。

3. 免疫调节作用

TGF-β 在机体免疫系统中具有广泛的影响，免疫系统中的多种细胞，如 MΦ、单核细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等都能分泌表达 TGF-β，许多免疫细胞胞膜表面都能分泌表达 TGF-β，许多免疫细胞胞膜表面都有其受体存在，并表现出对其刺激的特异性的反应性。目前认为，TGF-β 是免疫系统中重要的负调节因子。

TGF-β 可通过以下途径表现免疫抑制效应：①抑制免疫活性细胞的增殖；②抑制 B 淋巴细胞分化为免疫球蛋白分泌细胞；③抑制 T 淋巴细胞因子产生细胞；④抑制细胞毒 T 细胞、自然杀伤细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞活化等。

临床研究证实，TGF-β 的过度表达确与机体免疫抑制状态有关。某些肿瘤特别是恶性胶质细胞瘤患者的免疫功能抑制可能即是由肿瘤细胞中 TGF-β2 高水平的合成与分泌所致，当肿瘤切除后，机体又可以恢复相当正常的免疫功能。鉴于 TGF-β 的免疫抑制功能，目前将 TGF-β 做为免疫抑制剂应用于异体脏器移植以降低免疫排斥反应的研究正在进行之中。

TGF-β的生物学效应是广泛而复杂的(图 5-2),它的双重行为的生物学基础目前还不十分清楚,其重要意义还有待于阐明。

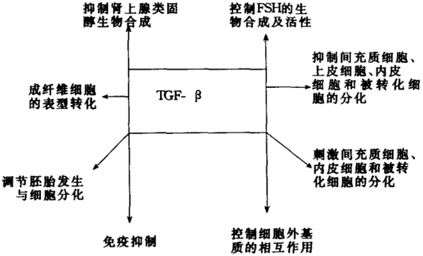


图 5-2　TGF-β的多种功能图

四、TGF-β对组织修复的作用

组织愈合的基础是炎症细胞和修复细胞的一系列活动。在软组织中,主要的炎症细胞有单核-巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等,主要的修复细胞有成纤维细胞、血管内皮细胞等。TGF-β影响着参与愈合的所有类型的细胞。

现在认为 MΦ 是组织修复的"指导者",在损伤愈合中十分重要。TGF-β作为外周血单核细胞的趋化剂,吸引它们聚集到伤口。体外研究发现,TGF-β在生理浓度时就能趋化单核细胞,单核细胞的迁移和向 MΦ 的转化对于启动组织修复至关重要。炎症区域较高浓度的 TGF-β可进一步激活 MΦ。活化的 MΦ 又可释放大量的生物活性物质,如 PDGF、FGF

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

等生长因子。这样 TGF-β 在体内的一些作用是间接的，它可能是吸引、活化单核细胞，刺激它们生成有丝分裂原和(或)化学趋化物质，通过这些物质再作用于其他细胞，如成纤维细胞、内皮细胞等，而发挥效应，促进肉芽组织的形成。

成纤维细胞的移行和合成细胞外基质是组织愈合的关键过程。TGF-β 可吸引成纤维细胞到受伤部位，并增强其基质的形成。其促进基质产生和抑制基质分解的具体机理是：①直接加强成纤维细胞胶原和 FN 的生成。②通过促进成纤维细胞合成和分泌纤维蛋白溶酶原激活物的抑制物，降低丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、金属蛋白酶和胶原酶的合成分泌，抑制已合成基质的水解。③对基质生成的间接作用。例如提高 FN 受体的合成；促进 MΦ 合成更多的 TGF-β，为成纤维细胞合成更多的基质提供了有利条件。TGF-β 对细胞外基质合成的促进作用是它在组织修复中的关键作用。

TGF-β 是一种血管诱生因子。在三维胶原培养中，它可诱导内皮细胞形成血管样结构。在体内，TGF-β 可能是间接诱导血管生成，TGF-β 对细胞外基质的诱导作用可能是血管内皮细胞分化成毛细血管的重要信号。TGF-β 可作为单核-巨噬细胞、成纤维细胞的趋化因子，而这些细胞又可释放血管诱生因子，TGF-β 通过这些因子间接影响血管生长。

许多动物实验应用了外源性的 TGF-β。结果发现，伤口局部一次性使用 TGF-β 后 3～5d 可观察到损伤处有更多的单核细胞和成纤维细胞，肉芽组织生长旺盛、排列有序，小血管含量远远高于对照组。以含胶原和肝素的海绵为载体，观察到 TGF-β 对豚鼠表皮损伤有明显的促进愈合作用。对开放性深度创伤，TGF-β 可增加伤口的抗断裂强度。外源性 TGF-β

还可逆转某些药物和放射性损伤所造成的伤口愈合受阻现象。

五、TGF-β在牙齿胚胎发育过程中的作用

在牙齿胚胎发育过程中，TGF-β参与了成牙本质细胞的分化调节。

牙胚发育期间充质细胞中存在TGF-β。钟状期造釉上皮和牙乳头细胞即有TGF-β1分布，细胞内TGF-β1位于外釉上皮、内釉上皮和成牙本质细胞顶端，细胞外TGF-β1主要位于星网层和牙乳头(D'souza RN,1990)。牙胚的内釉上皮、成熟的成牙本质细胞、成釉细胞均出现TGF-β阳性信号(Jepsen S,1992)。在鼠牙胚发育过程中，成牙本质细胞有TGF-β1、TGF-β3的表达。牙上皮只有和牙间质共培养时表达TGF-β1 RNA，而和非牙间质共培养时不表达。当于鼠磨牙牙乳头培养液中加入TGF-β1时，牙乳头组织中的前期成牙本质细胞并无充分分化，而当TGF-β1与肝素或纤维粘连蛋白(FN)复合时则出现成牙本质细胞样的分化(Ruch JV,1995)。

从而推测，TGF-β在牙本质形成早期调节细胞增殖，晚期调节细胞分化，牙胚发育过程中存在着TGF-β的旁分泌和自分泌机制；TGF-β在牙胚中可能发挥上皮诱导作用，诱导造釉细胞和成牙本质细胞分化；TGF-β在参与成牙本质细胞分化调节过程中需要某些细胞因子的协同作用；TGF-β对牙齿生长发育产生影响，对成牙本质细胞的分化作用是重要的。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

六、TGF-β对牙髓细胞的作用

在动物牙髓细胞培养中发现,TGF-β可促进牙髓细胞的DNA 和骨钙素合成（Lian RF, 1990; Nakashima M; 1992)。牙本质基质中存在的TGF-β可使牙髓细胞表达成牙本质细胞表型,调节牙髓细胞活性(Lesot H, 1993; Smith AJ, 1995)。TGF-β可诱导牙髓细胞极化，发生成牙本质细胞样功能分化。若用抗TGF-β单抗预先使TGF-β失去活性,则这种诱导作用消失(Dimitrios J,1995)。TGF-β对牙髓细胞的作用是多重性的,可能与牙髓细胞所处的分化、增殖状态有关。在 P_1～ P_4的牙髓细胞对TGF-β的反应中，P_1 系较 $P_{2\sim4}$ 系更能表达成牙本质细胞活性,而且,在低浓度TGF-β1 (0.1ng/ml)作用下,P_1 系 ALP 活性增加,而 $P_{2\sim4}$系细胞ALP 活性降低。高浓度TGF-β(5μg/ml)可以促进各系牙髓细胞DNA 合成,降低ALP活性(Shirakaw M,1994)。

以上观察结果表明,作为牙髓细胞的丝裂原,TGF-β在牙髓细胞的分化中发挥了积极的诱导作用,TGF-β可能通过牙髓细胞增殖分化参与牙髓组织修复。但目前还无基因水平的证据支持这一观点,它对牙髓细胞的生长分化究竟产生了什么影响至今还认识不清。

TGF-β、EGF是两种具有多种生物学功能的生长因子，广泛存在于正常组织中，以自分泌或旁分泌形式调节组织和细胞的生物学活动,在许多病理和生理过程中起着关键的调控作用。在体内实验中可发现牙髓炎症和修复过程中几种生长因子的变化。正常牙髓中成牙本质细胞虽无TGF-β、EGF合成,但当存在慢性刺激时,成牙本质细胞,特别是反应性牙

本质下方的成牙本质细胞呈明显的 TGF-β、EGF 阳性反应，表明成牙本质细胞在受到外界刺激后，具有合成和分泌 TGF-β、EGF 的能力。通过它们的作用进一步影响着牙髓的防御和修复反应，其中成牙本质细胞是牙髓自身修复潜能的重要细胞学基础。

此外，邻近洞底的牙本质小管和新沉积的反应性牙本质基质中也有 TGF-β 的阳性染色。已经证实，牙本质中含有 TGF-β 等多种生长因子，将牙本质溶于 20%EDTA 时，可见有释放出来的 TGF-β。因而推测，牙本质基质中的 TGF-β 的来源可能是成牙本质细胞的分泌，或是由钙化牙本质释放而来的。这两个来源的 TGF-β 和 EGF 通过刺激成牙本质细胞的基质合成而促进反应性牙本质的沉积参与牙髓的防御反应。龋病和磨损引起的反应性牙本质的形成可能是由牙本质中释放的 TGF-β 所介导的。

TGF-β 在牙髓修复过程中具有双向调节作用，一是介导逆转炎症反应的负反馈机制，一是与其他内源性活性物质一起进行组织修复。TGF-β 在牙髓修复中一个不可忽视的作用是它可以抑制过强的炎症反应，阻止因抗原刺激所造成的免疫损伤，对保护牙髓组织有重要意义。细菌及其毒性产物不仅具有直接的致伤作用，更严重的是引发免疫反应造成的组织损害。炎症和损伤牙髓中存在丰富的 TGF-β，可能吸收中性粒细胞、单核-巨噬细胞到炎症前沿。中性粒细胞释放水解酶和过氧化物酶激活 MΦ 等；激活的 MΦ 又可释放或激活大量炎症因子，如 IL-1、IL-2、IL-8、TNF-α 等，从而导致组织的炎症和损伤的修复。炎细胞的聚集和活化有助于消灭入侵的微生物和有害物质，在炎症早期有积极作用。但由于这些炎性介

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

质和炎性细胞的作用是非特异性的，所以持续的炎症反应同时可以造成组织结构破坏和代谢紊乱。TGF-β作为一种免疫抑制剂，可以抑制MΦ产生IFN-γ、IL-1、IL-2、IL-6、TNF-α等炎性因子；抑制INF-α等炎性因子；抑制INF-γ刺激的MΦ合成NO；诱导单核细胞分泌IL-1拮抗剂；拮抗TNF-α等的生物学活性，此外还可以抑制多种免疫细胞的增殖和活化。TGF-β对炎性因子的抑制作用对于限制这些因子介导的炎症反应是具有重要意义的。

鉴于细胞因子的网络关系，牙髓细胞内存在一个内容丰富，关系复杂的细胞因子网络系统，精细地调节着它的功能。例如炎症早期，TGF-β和TNF-α趋化和激活多种炎症细胞，炎细胞浸润到组织中并进一步合成分泌其他活性因子，介导炎症反应。若病源性刺激持续存在，炎细胞过度活化，炎症介质持续合成，TGF-β等负反馈调节因子不足以抑制过强的炎症反应，最终导致组织坏死。若刺激减弱或消除，组织则调节炎症因子的合成，以TGF-β、EGF等生长因子的活性为主，修复反应得以进行。而且TGF-β、EGF协同促进修复细胞的分化增殖和基质合成，最终导致组织的修复。因而，对细胞因子在牙髓炎症、修复过程中的调节作用的研究，不仅有助于提高对牙髓炎症和损伤修复机理的认识，而且也提示，如果采用适宜方法促进组织内有益因子的合成或抑制有害因子的产生，或合理外用生长因子则可有助于损伤牙髓的修复。

第七节　骨形成蛋白(BMP)

骨形成蛋白，又称骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic

protein，BMP)，是在骨组织中提取的具有成骨诱导(Osteoinduction)作用的酸性低分子多肽，是由 Vrist 于 1965 年首先发现并报道的重要骨诱导因子。此后，人们对 BMP 作了大量的研究。1988 年以来，Wozney 等先后又发现了 8 种 BMP 基因，它们分别为 BMP_1、BMP_{2A}、BMP_{2B}、BMP_3、BMP_4、BMP_5、BMP_6、BMP_7 等。现已将 $BMP_{1\sim8}$克隆化，其中 BMP_1 具有蛋白酶样结构，$BMP_{2\sim8}$均属转化生长因子-β(TGF-β)类，对细胞外基质(ECM)的成分，如胶原(Collagen)、纤维粘连蛋白(FN)的产生起促进作用。在 BMP 家族成员中，除 BMP_1 仅能诱导软骨形成外，其他的 BMP 在单独应用时均能诱导软骨和骨的形成，其中 BMP_2 的诱导骨活性最强，其他的 BMP 可能与 BMP_2 有协同关系，共同参与诱导成骨过程。

一、BMP 的分布和功能

1989 年，成功的制备抗牛骨形成蛋白生物活性基因座的单克隆抗体(bBMP-McAb)，并采用免疫组化方法进行研究，结果表明，BMP 广泛分布在骨基质的胶原纤维、新生的骨基质、成骨细胞和骨髓细胞中。

BMP 在成骨诱导中的作用有：

(1)BMP 可在软组织和骨缺损中诱导血管周围的未分化间充质细胞转化为软骨和成骨细胞，进而形成软骨和骨组织。

(2)BMP 在诱导骨形成过程中往往经过细胞的增生、分化和骨组织形成等阶段。在细胞增生期，BMP 周围有大量未分化间充质细胞增生和核分裂相；在细胞分化期，有大量的间充质细胞生长活跃，核丝裂明显，并向成软骨细胞和成骨细胞分化形成新骨。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

(3)BMP可加速骨质缺损的修复，在不能自行愈合的各类骨质缺损中，均能诱导骨质生长、修复骨质缺损，形成骨质的量与BMP的量成正比。目前已利用BMP这一特性，将其用于颌骨缺损、颌骨囊肿术后及牙槽骨缺损修复的临床治疗并获得成功。

对BMP的大量研究还证明，这种蛋白没有种族的特异性，人和牛骨的BMP抗原决定簇是相同的，人、猴、牛和鼠的骨基质中提取的BMP具有同源性(Homology)，这为临床应用牛骨BMP修复人的骨缺损提供了可靠的依据。由于bBMP-McAb不仅是一种有效的检测BMP标记和显示物，而且具有专一封闭BMP诱导新骨形成的功能，因而可以使用这种单克隆抗体有效地封闭BMP的作用，达到抑制骨生长和骨形成的目的，为骨肉瘤、软骨肉瘤等骨肿瘤及与之相关的骨疾病的临床治疗开拓广阔前景。

二、牙胚发育中的BMP

近年，在采用bBMP-McAb对牙齿和牙胚的研究中证明，在牙板、帽状期冠部的内釉细胞以及其后钟状期的造釉细胞、外釉细胞、成牙本质细胞中都含有丰富的BMP，并发现随着牙本质的形成，BMP直接沉积在前期牙本质中。在牙胚中，能分泌BMP的细胞主要是造釉器上皮细胞、牙乳头细胞、成牙本质细胞和牙囊细胞。造釉器细胞具有合成和分泌BMP的功能，成熟的成牙本质细胞也具有合成和分泌BMP的功能，成牙本质细胞在形成牙本质基质的同时也将胞浆中的BMP分泌出来并沉积在牙本质基质中，这部分BMP对于今后的牙齿形成及萌出后修复牙本质的损伤具有重要作用，

说明在牙齿发育和形成的复杂和连续的生物学过程中,BMP是至关重要的。

三、牙本质基质蛋白

牙本质基质蛋白(Dentin matrix protein, DMP)或称之为牙本质骨形成蛋白(DBMP)是以脱钙的牙本质基质中提取出来的不溶性非胶质蛋白质。1957年,Schaffer首次将牙本质和牙骨质颗粒植入到狗和猴的牙槽骨缺损区,证实了在植入颗粒的表面有骨组织沉积。1967年,Yeomans和Vrist一起将脱钙的牙本质分别植入到兔的下颌骨缺损、腹直肌及拔牙后牙槽窝,发现植入物可以诱导这些区域的血管周围未分化间充质细胞分化并形成软骨和骨组织。1986年,Inoue等发现,将同种牙本质基质脱钙后植入多个不同部位可诱导出软骨和骨的形成。因而,人们的实验研究都证实了牙本质基质中的蛋白质具有高效的骨诱导性。现已发现,DBMP具有与从骨基质中提取的BMP类似的生物学特性及相近的分子量。Kawai和Vrist等人认为,从牙本质中提取出来的这种DBMP其实就是BMP。

四、BMP在牙髓修复中的作用

骨形成蛋白是一种高效的骨诱导因子。人们对BMP在牙髓修复中的作用也进行了研究。1990年,Nakashima观察了狗牙的BMP盖髓后修复性牙本质的形成状况,结果最先表现的是轻微的细胞介导的免疫反应和BMP吸收,而后是间充质细胞的增殖和血管的侵入,最后是骨样牙本质和管样牙本质的形成。Nakashima认为BMP可促进牙髓间充质细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

胞增殖，诱导成牙本质细胞分化和骨样、管样牙本质形成。1992年，高玉好等在BMP诱导牙本质形成的实验中，将高度纯化的BMP置于创面上，每颗牙约达500μg。结果，BMP盖髓后2～3周即开始有骨样牙本质和管样牙本质形成，并组成了完整的牙本质桥，骨样牙本质中有成骨细胞样细胞埋入，管样牙本质中有清晰的牙本质小管和成牙本质细胞。管样牙本质散布于骨样牙本质中，两者相互移行。以形成牙本质桥的组分看，既有规则的管样牙本质，也有大量不规则的骨样牙本质，这可能与BMP在组织中的扩散有关。因BMP盖髓后在组织中能很快扩散，BMP颗粒成为牙髓细胞分化的中心，距离BMP较近的细胞分化为成熟的牙本质细胞。继而形成典型的管样牙本质，稍远的牙髓细胞由于得不到足够的分化信息而分化为不成熟的牙本质细胞，形成骨样牙本质。从而证实，BMP可以诱导牙本质形成，包括骨样牙本质和管样牙本质。同时，在临床治疗中，BMP盖髓的效果不低于氢氧化钙，显示出了BMP在临床保存活髓治疗方面的应用前景。

但是，BMP是一种蛋白质，在体内易被吸收，且不能提供硬组织沉积的支架。因而，作为盖髓剂，BMP的应用有其局限性。在BMP应用方面，不仅受到其绝对用量和纯度的影响，而且载体是一个十分重要因素。

目前常用的载体有牙本质陶瓷和各种生物活性材料，如羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP)等。有人将BMP与牙本质陶瓷复合用于盖髓，发现诱导的牙本质主要是骨样牙本质，并与牙本质陶瓷颗粒相互融为一体，组成完整的牙本质桥。BMP与牙本质陶瓷复合后，形成了BMP缓慢释放系统，其中的BMP缓慢向周围释放，作用于牙髓细胞，延长了BMP

有效作用时间，减少了绝对用量。在 BMP 的临床应用中，若将 BMP 与载体复合，再配以不影响 BMP 生物诱导活性的抗生素、镇痛药物等，以满足临床的诱导作用、消炎镇痛、X 线阻射等要求，其临床疗效可望更好。

五、微环境对 BMP 诱导作用的影响

近年，在 BMP 的研究中，人们提出一个微环境问题，即局部环境对骨诱导过程可能具有一个从促进到抑制的影响范围。不论在体内还是在体外实验中，骨诱导的成功非常有赖于局部微环境的作用，因该环境可以允许一些调节因子在宿区或植入区发挥作用。未分化间充质细胞在特定环境中，在受到 BMP 诱导分化的同时，还受到其他因子或因素的作用，使得未分化间充质细胞在不同的微环境状况下受到 BMP 诱导而向着不同方向转化，因而出现了在牙髓和牙乳头中向成牙本质细胞转化，在牙周组织环境中向成牙骨质细胞和成骨细胞转化而形成牙骨质和牙槽骨等现象。因而，今后在对 BMP 骨诱导的研究中，应包括对局部微环境的未知调节因子或因素的研究。

六、BMP_3 的有关研究

在人们对 BMP 相继进行研究时，1987 年，Sampath 等用肝素亲和层析及反相高效液相色谱技术从牛脱矿骨基质中提取到一种不同于 Vrist 的 BMP 的骨诱导蛋白，命名为成骨素(Osteogenis)。1989 年，Luyten 等将纯化的成骨素降解，分离后进行氨基酸序列分析，发现其与 TGF-β 超家族的部分蛋白有高度同源性，与 Wozney 在哺乳动物真核细胞表达的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

BMP_3的氨基酸序列基本相同，因而多数学者认为成骨素就是BMP_3。

BMP_3即成骨素，归属于TGF-β超家族，其分子量为30 000～40 000，为一种疏水性非胶原糖蛋白，为二硫键结合的二聚体结构。实验研究发现，成骨素与载体结合后可通过诱导激活成骨细胞表型的表达而具有骨诱导活性，其骨诱导活性较 Vrist 的 BMP 的骨诱导活性大 1 000 倍，即 1～5μg 成骨素诱发的新骨量相当于 1～5mg Vrist BMP 的成骨量。当成骨素经还原和烷基化后，其分子量为22 000，且诱导活性消失。

成骨素与肝素、羟基磷灰石、刀豆素 A、胶原等复合有很强的亲和力。Reddi 等(1991) 发现牛成骨素与Ⅳ型胶原的亲和力很强，与Ⅰ、Ⅸ型胶原的亲和力则相对较弱。而血管基底膜上Ⅳ型胶原的含量极丰富，成骨素与其相关的 TGF-β 同新生血管的基底膜结合，在局部诱导骨分化过程中发挥重要作用。Vukicevic 等(1990) 用放射自显影技术研究了大鼠胚胎发育过程中牛成骨素在软骨和骨的结合位点，结果显示：中胚层来源的组织，包括软骨(膜)、骨(膜)结合位点数最多，而其他组织，如肌肉、肝、脾、皮肤、脑、心、肾和肠的结合位点数依次递减，说明它在骨形态发生中亦有重要作用。Vukicevic 等于 1994 年指出，成骨素尽管最初是从骨基质中分离出来的，但也可由其他组织合成，并可能调节人胚肺、肾、小肠的形态发生和(或)功能调节。

BMP_3 在肌体内广泛分布于神经外胚层来源的组织和细胞，不仅具有成骨作用，而且参与胚胎分化过程。Tabas 等(1993)采用 cDNA 探针杂交技术对 BMP_3 在体细胞染色体

上进行定位研究，发现 BMP_3 基因座与二型牙本质发育不良的基因座相重叠，提示 BMP_3 在牙本质形态发生及发育过程中可能发挥重要作用。

在采用地高辛甙元标记的 cDNA 探针，研究不同状态下牙髓组织中 BMP_3 mRNA 的分布特征时发现，健康牙髓组织中的血管内皮细胞、成牙本质细胞即有合成 BMP_3 的能力，浅龋、深龋和(或)局限性炎症的牙髓组织中 BMP_3 合成的量增加，表明在龋源性炎症刺激下，BMP_3 基因激活表达，并参与牙髓细胞的诱导分化过程。其中，值得注意的是，人牙髓血管内皮细胞不仅有合成和分泌 BMP_3 的能力，而且在修复性牙本质形成的龋病牙髓组织中，在其下方的血管周边和周围出现了 BMP_3 mRNA 阳性杂交信号的未分化间充质细胞和牙髓细胞。表明，血管内皮细胞也可以通过合成分泌 BMP_3 参与牙髓细胞的诱导分化过程(旁分泌作用)；同时还可以直接移行分化为未分化间充质细胞，所合成分泌的 BMP_3 作用于自身(自分泌作用)或分化增殖为新的内皮细胞。此外，由于内皮细胞始终与血液相接触，它合成的 BMP_3 有可能分泌入血，随血液循环到达牙髓的各个部位，参与牙髓组织的生理活动。因此，通过对 BMP_3 的研究，证实了牙髓血管内皮细胞在牙髓自身修复中起重要作用。

第八节 成纤维细胞生长因子(FGF)

成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)最早是从牛脑垂体中发现的，是对成纤维细胞具有明显生长促进作用的因子。后来发现，除成纤维细胞外，FGF 对中胚层

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

来源的细胞，尤其是血管内皮细胞也有明显的增殖作用。体内几乎所有组织均含有 FGF 或 FGF 样活性物质。

一、FGF 的分类和产生

FGF 的种类繁多，根据 FGF 的等电点，可将 FGF 分成两大类，即酸基性的 FGF(aFGF)和碱基性的 FGF(bFGF)。二者都是分子量为 15 000～18 000 的单链蛋白，相互之间有 55%的同源性，可作用于同一受体，并发挥相似的生物学效应。不同动物来源的 bFGF 非常相似。bFGF 广泛分布于各种组织，是由多种细胞，包括 MΦ、成纤维细胞、血管内皮细胞等合成的。根据作用的靶细胞不同，bFGF 的某些生物学效应比 aFGF 强 30～100 倍。由于 aFGF 和 bFGF 的生物学活性受 TGF-β 的正向或负向调节。因此，当不同组织合成 FGF 或 TGF-β 的能力以及微环境中这些因子相对浓度发生变化时，可选择性地促进或抑制细胞的分裂和分化。二类 FGF 的生物学活性的特点是，酸性 FGF 与肝素结合后活性可以显著增加，它们的靶细胞主要来源于中胚层衍生的细胞。

二、FGF 受体

FGF 受体可能是一种单链多肽，分子量为 110 000～150 000，每个细胞上的受体数 2 000～80 000。aFGF 和 bFGF 是通过同一受体发挥生物学作用的。该受体具有两个结合区，其特点是不进行酪氨酸磷酸化，但却是一种依赖钙和磷脂的物质，具有苏氨酸特殊 C 蛋白激酶的活性。

尽管 bFGF 与 aFGF 在体内的分布十分广泛，但目前除脑组织外的许多组织中要确定合成 FGF 的 mRNA 却十分困

难，即使在FGF增加时也很难见到mRNA的增加。因此有人认为，FGF在正常情况下可能有一种储藏形式，以应付紧急情况下的需要，如创伤修复等，这一点可能受到靶细胞局部调节作用的影响。

三、FGF的生物学作用

FGF的体外作用十分强烈，在pg～ng/ml浓度范围内即可对BALB/C_3T_3、人和牛的羊水成纤维细胞、牛的角膜上皮细胞等产生强烈的增殖作用；FGF有促骨细胞有丝分裂作用，成骨细胞可产生aFGF和bFGF，bFGF的活性形式存在于细胞外基质中，作为一种自分泌或旁分泌性因子发挥生理功能，增加骨细胞内骨钙素含量，降低细胞内碱性磷酸酶活性和胶原产物。在FGF家族中，bFGF是最早被纯化和鉴定的成员，对其生物学效应的研究比其他成员多，已成为该家族的代表。

FGF在体内生物学作用有：①强烈促进成纤维细胞的增殖，参与血液凝固后的创伤愈合；②参与神经再生过程；③刺激血管新生；④参与肿瘤的生长等。

FGF分布于多种组织，作用广泛，可诱导大多数来自中胚层和神经外胚层的培养细胞的有丝分裂，稳定培养细胞表型的表达，促进毛细血管内皮细胞的增生和细胞的分化，在胚胎形成，血管新生，神经营养和创伤愈合等方面起着重要作用。

四、FGF在创伤修复中的作用

FGF在创伤修复中的作用主要来源于它对成纤维细胞、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

平滑肌细胞、骨骼肌成纤维细胞等间质细胞的强力促有丝分裂作用，它不仅刺激这些细胞增殖，同样也可以促进其分化。

有关 bFGF 在创伤修复中的作用，在 Buntrock 进行的一系列研究中得到以下结论：①FGF 可以刺激创伤修复中的肉芽组织的再生，这种再生包括细胞与细胞外基质的再生，以及 FGF 直接作用于靶细胞，即成纤维细胞与内皮细胞的再生。②FGF 可以显著刺激毛细血管再生，增加肉芽组织中的血液供应。③FGF 对组织修复作用有剂量-效应依赖关系，因 FGF 的迅速降解，只有反复应用才能维持其刺激生长效应。④增生的胶原组织中含有 I 型胶原和 Ⅲ 型胶原，其中以 Ⅲ 型胶原的羟脯氨酸含量最高，I 型胶原含量低。

组织损伤后内源性产生或外源性加入的 bFGF 可以通过以下途径促进愈合：①通过趋化作用和促细胞迁移作用导致 MΦ、间充质细胞、内皮细胞、成纤维细胞等向创伤部位聚集，启动创伤愈合过程。②促进几乎所有参与创伤愈合的细胞增殖，刺激细胞外基质的合成。③促进新生血管形成。④促进细胞释放胶原酶、血纤溶激活酶。

aFGF 在创伤修复中的作用，主要表现在内皮细胞生长因子(Endothelial cell growth factor, ECGF)的效应上，因 ECGF 是 aFGF 分类中的一种，在体外能够有效地促进血管内皮细胞及成纤维细胞生长，在体内能够促进血管增生，与肝素结合后其促分裂活性大为增加。已有的研究表明，aFGF 在创伤修复中可参与以下反应：①促进肉芽组织增生，加速伤口愈合。因在肉芽组织中毛细血管内皮细胞与成纤维细胞是主要细胞，ECGF 不仅能促进血管内皮细胞的分裂增殖，加速毛细血管形成，同时还能促进成纤维细胞的生长，以及胶原合

成。②ECGF是人血管内皮细胞体外传代培养不可缺少的物质，它作为血管衬里，除了起屏障作用外，还有抗血栓形成，调节血管平滑肌的增殖与收缩反应及参与某些物质代谢与转化等功能。③促进角膜上皮生长，用于角膜损伤。④促进软骨、骨细胞再生，用于骨折治疗。

aFGF为自分泌生长因子，参与正常创伤修复过程，促进上皮细胞增殖及创伤愈合的作用比bFGF强。

总之，FGF通过诱导一系列有益于组织修复的细胞反应而促进创伤愈合过程，如吸引有关细胞到达伤口，刺激细胞释放基质降解酶到达伤处，刺激成纤维细胞的增殖和新的细胞外基质的合成。因此，FGF类物质促进创伤修复的作用是肯定的，无论是bFGF还是aFGF，从实验研究和临床应用都得到证实。但如何设计一种适宜的装置来释放FGF入创伤局部，以使FGF能更好地发挥生物学效应，是一项有待研究的工作。

近年，也已开展FGF对牙周膜成纤维细胞和牙髓细胞DNA合成作用的研究，发现FGF可使DNA合成量提高182%。aFGF和bFGF均可刺激原代培养的牛牙髓细胞DNA合成，使ALP活性下降。在对bFGF在人牙胚中表达的免疫组化定位研究中发现，钟状期牙胚中内釉细胞层和成牙本质细胞层bFGF为强阳性；牙乳头组织中阳性细胞分布不均，其中牙乳头的血管内皮细胞也为强阳性。鉴于牙源性上皮、成牙本质细胞和牙乳头间充质细胞中均有BMP-2A的杂交信号分布，表明bFGF在牙胚发育中的表达与BMP相似，它们在诱导外胚层、中胚层的发育中起着协同作用，共同促进内釉上皮向成釉细胞和牙乳头细胞向成牙本质细胞的分化。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

外源性的 aFGF 可使培养的牙胚体积增大，而且可调节牙齿发育的大小和速度。FGF 是牙胚发育不可缺少的生长因子。

第九节 胰岛素样生长因子(IGF)

胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor，IGF)是一族既有胰岛素合成代谢作用又有生长促进作用的多肽。人血浆中的 IGF 主要有两种，分子量分别为 7 649 和 7 471。其中 IGF Ⅰ为一种生长激素(GH)依赖性的碱性蛋白，等电点 8.6，内有 3 个二硫键桥。其组成的 70 个氨基酸中，有 48%的氨基酸顺序与人的胰岛素前体(Human pro-insulin)具有同源性，而 IGF Ⅱ 则为一种中性单链多肽，GH 依赖活性较低，由 67 个氨基酸组成，其中约有 50%的氨基酸排列与 IGF Ⅰ和胰岛素相似。

一、IGF 的合成和分泌

体内能合成和分泌 IGF 或 IGF 样多肽的组织和细胞相当广泛，并且影响其分泌的因素也很多，例如年龄、性别、怀孕、营养状况、生长激素、甲状腺素、催乳素、雌激素和负反馈等，在这些因素中，有的是促进 IGF mRNA 的转录，有的则是单纯增加 IGF 及细胞的分泌，但其调节机制主要由自分泌和旁分泌两种形式控制。在 IGF 的分泌中，细胞类型的特殊营养刺激(Specific trophic stimuli)是决定局部 IGF 分泌浓度的主要因素，而旁分泌机制则对平衡循环血中的 IGF 浓度有重要影响。血浆中的 IGF 是与其特异性的载体蛋白相结合的形式而存在的，载体蛋白主要存在于血浆外液之中。

二、IGF 受体

机体内能合成和分泌 IGF 的细胞有 18 种之多，具有 IGF 受体的组织和细胞也很广泛，它们不仅存在于细胞膜上，同样在细胞内的滑面内质网与高尔基体等结构中也发现有 IGF 特异性结合位点。能与 IGF 相结合的受体有三种亚型，即Ⅰ型 IGF 受体、Ⅱ型 IGF 受体以及胰岛素受体。

三、IGF 的生物学作用

IGF 与胰岛素对细胞周期有特殊的影响，但这种影响并非是 IGFⅠ和 IGFⅡ作为单一因子而发挥作用的，它们既不能单独促进静止的细胞进入增殖周期，也不能促进 DNA 的合成，其促分裂作用是在同其他生长因子，如 PDGF、FGF 的协同效应下共同完成的。IGF 的另一个主要作用是刺激细胞的分化和促进细胞的合成。有研究表明，IGF 对维持与细胞分化有关的蛋白质的水平是十分必要的。

IGF 的大部分生物学效应是与其他细胞因子相协同来完成的。在协同的细胞因子中，以 IGF 和 PDGF 的相互协同作用最为密切。

四、IGF 在牙胚发育中的作用

IGFⅠ对牙髓细胞的生物学效应有多种，可刺激体外初代培养牛牙髓细胞的增殖和粘蛋白的合成。在牙胚发育过程中，前期成牙本质细胞和功能性成牙本质细胞都有受体的表达。在体外，IGFⅠ对成骨样细胞的增殖作用等同于小牛血清。对体外培养的鼠磨牙牙胚的细胞分化作用同样如此，在无

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

血清的培养条件下，牙胚的体积不能增大，牙本质基质的分泌不佳，成釉细胞不出现完全分化。IGF Ⅰ加入培养中后，牙胚体积增大，细胞分化更早，表明 IGF Ⅰ可促进成牙本质细胞的分化和成熟及调节分化后的细胞功能。IGF Ⅰ还可能参与成牙本质细胞的极化过程，将分离的 17 日鼠牙胚牙乳头组织于琼脂半固化培养液中培养，IGF Ⅰ与肝素复合后，导致广泛的细胞分化。有意义的是，IGF Ⅰ与肝素复合作用后诱导的成牙本质细胞不表达 TGF-β1 的基因表型，这可能是细胞因子网络作用的结果。

第十节　凝血因子Ⅷ

一、凝血因子Ⅷ的产生和存在形式

凝血因子Ⅷ(Binding of factor Ⅷ)又称Ⅷ因子，是由内皮细胞产生的，与凝血过程密切相关的一种重要因子，它是由 von Willebrand's Factor(vWF)与促凝蛋白组成的复合体，vWF 又称为Ⅷ因子相关抗原，是血小板吸附功能所必需的物质。以复合体形式存在的凝血因子Ⅷ可以保护促凝蛋白组分，使之不被蛋白分解酶灭活，人体正常组织中的动脉、静脉和毛细血管的内皮细胞、血小板及单核细胞上都有 vWF 存在，炎症反应性增生性血管病变中均可提取该因子，目前 vWF 已作为内皮细胞的可靠标记物。

二、凝血因子Ⅷ的功能

内皮细胞分泌的 vWF 直接进入血液中和周围结缔组

织，可介导血小板与暴露的胶原和氨基葡萄糖粘附，成为分子之间的“桥蛋白”，在血管破损、渗透处，这种桥蛋白可以促进血小板凝血酶的合成，而且，vWF 还可与Ⅷ因子形成非共价复合物，防止这一初级阶段凝血因子从循环中过早排泄，在局部发挥有效的凝血。因此，通过对 vWF 的研究表明，血管内皮细胞在炎症时积极参与了凝血过程，它在组织自身稳定方面发挥了重要作用。

三、内皮细胞的作用

由于内皮细胞始终与血液接触，所以它与循环调节、凝血、炎症、血管增生和免疫反应等生理、病理过程密切相关，特别是在炎症、免疫应答和血栓形成等情况下，内皮细胞成为主要的反应场所。在炎症过程中，细胞间质变性，局部血管通透性增高，血浆渗出均与内皮细胞的功能有关。

内皮细胞的功能繁多，其主要作用可以有：①内皮细胞可粘附炎性细胞，协助炎细胞向血管外渗出；②内皮细胞还可以产生以白细胞介素-1 为主的多种细胞因子，而这些细胞因子和其他炎性细胞因子又可以促进血管新生；③内皮细胞与血液凝固和纤维溶解机制有关，在生理情况下内皮细胞的纤溶活性占优势，炎症时在细胞因子和细菌内毒素的刺激下则以凝血活性占主导地位，内皮细胞在慢性炎症中表达 Ia 抗原，参与免疫应答。

四、牙髓中的凝血因子Ⅷ

1991 年，Jacoby 等人首次发现，炎症牙髓中 vWF 明显增高，认为此因子对牙髓的自身稳定和修复等方面的作用是

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

有积极意义的。近年，对正常和炎症牙髓中的内皮细胞和 von Willebrand 因子进行免疫组化的研究结果表明，正常牙髓中血管较少，多呈闭合状态，阳性着色强度均匀，位于全部血管壁的内皮细胞上。炎症牙髓中血管扩张，血管数目明显增多，约为正常牙髓的 2.27 倍，微血管截面积约为正常组织的 6.83 倍。正常牙髓中 vWF 在血管壁上呈颗粒状阳性着色，同一血管染色强弱不一，炎症牙髓中 vWF 的染色强度明显增高，其着色范围大于内皮细胞，甚至扩展到血管腔内，说明炎症状况下内皮细胞积极参与了 vWF 的合成和分泌。

炎症牙髓中的血管内皮细胞显著增生和血管扩张，其意义在于增加病灶组织的氧供给，输送足够的营养物质维持组织、细胞的代谢，而且，作为免疫细胞的内皮细胞增强 Ia 抗原的表达，提高对抗原处理和递呈能力，动员炎细胞和免疫细胞，增强牙髓防御能力，促进病变愈合。在龋病病原物质的持续作用下，内皮细胞可介导粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞聚集在病变区，使炎症处于慢性状态，同时，内皮细胞增生、凝血活性亢进有助于避免血液成分的过量渗出而引起牙髓组织内压升高。

主要参考文献

1. 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学. 北京：世界图书出版公司，1995
2. 傅小兵编著. 生长因子与创伤修复. 北京：人民军医出版社，1991
3. 程违，李春德主编. 免疫生理学. 上海：上海科学技术出版社，1993
4. 李君璎，黄惟让. 免疫生物学概论. 北京：高等教育出版社，1992
5. D'souza R, Brown LR, Newland JR, et al. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. Arch Oral Biol, 1989,34(5):307～313
6. Cers Heyden, Aarde. IL-6 in serum and wrine of renal transplant recipiets.

Clin Exp Immund, 1988, 71: 314
7. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammation cytokine messenger RNA(mRNA)-expressin cells in human inflamed gingiva by combined in situ hydridization and immunohistochemistry, Immunology, 1992, 76: 42
8. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assessment of interleukin- 6 in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal, 1994, 65: 147
9. Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J Periodont Res, 1991, 26: 339
10. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell I, et al. IL-4 and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. J Oral Pothol Med, 1994, 23: 347
11. Bando Y, Henderson B, Meghji S, et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. J Oral Pathol Med, 1993, 22: 221
12. Meghji S, Henderson B, Bamdo Y, et al. Interleukin- 1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts. Archs Oral Biol, 1993, 37(11): 935
13. Matsushima K. Molccular coning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor(MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med, 1988, 167: 1883～1893
14. Schroedr JM, Mrowietz U, Morita E, et al. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. J Immunol, 1987, 139: 3474～3483
15. 秦军志综述. 肿瘤坏死因子在创伤愈合过程中的调节作用. 国外医学：口腔医学分册，1993，20(6)：339～341
16. 药俊. 牙髓拟杆菌 ATCC 35406 内毒素脂多糖对肿瘤坏死因子(TNF)的诱导活性. 牙体牙髓牙周病学杂志，1992，2(1)：15～17
17. 侯本祥. 内毒素脂多糖在牙髓炎症中致病机理的实验研究. 西安：第四军医大学博士学位论文. 1996
18. 文玲英，吴兴裕，朱明光. 内毒素血症致牙髓组织病理学改变的实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志，1997，7(3)：156～158
19. Vlevitch RJ, Tobias PS. Keceptor- depentent mechanisms of cell stimulation

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol, 1995,13:437～457

20. Pugin J, Schurer-Maly CC, Letureg D, et al. Lippolysaccharide(LPS) activation of human endothelid and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD_{14}, Proc Natl Acad Sci USA, 1992,90:2744～2748
21. Kirkland TN, Finley F, Letureg D, et al. Analysis of Lipoplysalcharide binding by CD_{14}. J Biol Chem, 1993,268:4818～4823
22. Zieqler-Heitrock HWL, Vlevith RJ. CD_{14}: cell surface receptor and differentiation marker. Immunol Today, 1993,14:121～125
23. Ferrecro E, Hsich C-L, Franckell, et al. CD_{14} is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. J Immunol, 1990,145:331～236
24. Samsel RW, Nelson DP, Sanders WM, et al. Effect of endotoxin on systemic and skeletal muscle O2 extraction. J Apple physiol, 1988,65:1377～1382
25. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al. Identity of tumor necrosis factor and macrophage-secretar cachection. Nature, 1985,316:552
26. Klebanoff ST, Vodas MA, Harlar JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J Immunol, 1986,136:4220～4225
27. Camussi G, Albano E, Tettal et al. The molecular action of tumor necrosis factor-α. Eur J Biochem, 1991,202:32
28. Trecey KJ, Fong Y, Hesse OG, et al. Anti-cachetin TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. Nature, 1987,330:662
29. 陈强. 血小板衍化生长因子对牙髓和牙周组织细胞生物学作用的基础研究. 西安:第四军医大学博士学位论文, 1996
30. Bowen-Pope DF, Ross R, Mcthods for studying the platelet- derived growth factor receptor. Methords Enzymol, 1985,109:69～100
31. Bloms, Holmstrup P, Dabelsteen E. A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet- derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology. J Poriodontal, 1994,65:373～378
32. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, et al. Mitogenic, chemotactic, and syn-

thetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to poly peptide growth factor in vitro. J Periodontol, 1992,63:515～525

33. 傅小兵，田惠民综述. 生长因子调控组织修复的机理. 国外医学:创伤与外科基本问题分册，1992,13(3):15～153

34. 李永林综述. 上皮生长因子和创面愈合研究进展. 国外医学:创伤与外科基本问题分册. 1993,14(3):15～18

35. 费哲内综述. 肽生长因子和伤口愈合. 国外医学:创伤与外科基本问题分册. 1992,13(3):175～176

36. 张大青，周萍，李叶群等. EGF 对火器伤愈合的初步研究. 中华创伤杂志，1995,11(3):151～153

37. Kasselberg AG, Drth DN, Gray ME, et al. Immunocytochemical location of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. J Histochem Cytochem, 1985,33:315

38. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem, 1990,265:7709

39. Pessa ME, Bland KI, Copeland EM. Ⅱ Growth factors and determinants of wound repair. J Surg Res, 1987,42:207

40. Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal grwth factor during wound repair. J Invest Dermator, 1990,94:624

41. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, et al. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. J Surg Res, 1987,43:322～328

42. Liang RF, Nishimura S, Maruyama S, et al. Effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factor on clanal rat pulp cells. Arch Oral Biol, 1990,35(1):7～11

43. Dimitrios T. Basic mechanism of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol, 1995,39(2):281～290

44. Marti V, Burwen SJ, Jones AL. Biology effects of EGF, with emphasis on the gastrointestinal tract and live, and update. Hepatology, 1989,9(1):126～128

45. Carpenter G. Epidermal growth factor Ann Rev Biochem, 1979,48:193～

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

201
46. Gonal B, Erdogan D. Effect of EGF dosage ferms on alkaliburned corneal wound healing of mice. Burns. 1995,21:7~10
47. Cam Y, Neumann MR, Ruch JV, et al. Immunolocalization of TGF-β1 and EGF epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. Arch Oral Biol, 1990,35(10):813~822
48. 侯军综述. β转化生长因子的生物学功能. 国外医学:口腔医学分册, 1992, 19(6):350~353
49. 朱旭东, 张艳. 转化生长因子-β与软组织伤口愈合. 生理科学进展, 1993, 14(4):193~194
50. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- beta. J Cell Biol,1987,105 (9):1039~1045
51. D'souza RN, Happornen RP, Flanders KC, et al. Histochemical localization of transforming growth factor-betal in developing rat molars using antibodies to diferent epitopes. J Biol Buccale, 1990,18(4):299~306
52. Vaahtokari A, Vainoio S, Thesleff I, Associations between transforming growth factor beta 1 RNA expression and epithelial musenchymal interactions during tooth morphogenesis. Development, 1991,113(3):985~994
53. Ruch JV, Lesot H, Begue-kirn C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol, 1995,39:51~68
54. Jepsen S, Schiltz P, Strog DD, et al. Transforming growth factor- α1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization potential role for the stratum intermedium. Archs Oral Biol, 1992,37(8):645~653
55. Dimitriors Tziafas. Basic mechanisms of cytodifferentition and dentinogenesis during dental palp repair. Int J Dev Biol, 1995,39:281~290
56. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. J Dent Res, 1994,73(9):1509~1514
57. Be'gue-Kirn C, Smith AJ, Leriot M, et al. Comparative analsysis of TGF-

betasl, BMPs, IGF, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene experesion during normal and in vitro induced odontoblast diferentiatin. Int J Dev Biol, 1994,38(3): 405~420
58. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, et al. Odontoblast stimulation inferrets by dentine matrix components. Archs Oral Biol, 1994,39(1):13~22
59. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, et al. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol, 1995,39:273~280
60. Masafumi K, Kensella JL. Reorganization endothelial cordlike struetures on basement membrane comples: involvement of TGF-β1. J Cell Physiology, 1994,161:267~276
61. Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentiongenesis. a review. Int Endo J, 1994,27:61~74
62. Nakansishi T, Matsuo T, Enidu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulp. J Endodon, 1995, 21(3):131~136
63. 杨连甲，金岩，胡蕴玉主编. 口腔和骨科的生物活性材料. 西安：陕西科学技术出版社，1993
64. 金岩综述. 牙齿和骨形成蛋白(BMP)的关系. 国外医学:口腔医学分册，1992,19(6):342~346
65. 高玉好综述. 骨形成蛋白和牙本质形成. 国外医学:口腔医学分册，1995,22(3):158~161
66. 王忠东，文玲英综述. 牙髓自身修复潜能研究进展. 国外医学:口腔医学分册,1996,23(2):65~69
67. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, et al. A bovine low molecnlar weight bone morphogenetic protein(BMP) fraction. Clir Orthop, 1982,162:219
68. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science, 1988,242:1528~1534
69. Yang Lianjia, Gao Yuhao. Bovine bone morphogenetic protein- induced dentinogenesis. clinical Orthophaedies and Related Research, 1993,295:305~312
70. Nakashima M. THe induction of reparative dentine in the amputated dental

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

pulp of dog by bone morphogenetic protein. Arch Oral Biol, 1990,35(7): 349

71. Nakashima M. Induction of dention formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. J Dent Res, 1994,73:1515～1522

72. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteoginin, an extracellular matrix-associated, bone-induction protein, by heparin affinity chromatography. Proc Nati Acad Sci USA, 1987,84:7109～7113

73. Reddi AH, Cuningham NS. Recent progress in bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins: chanllenges for bionmechanical and tissue entineering. J Biomech Eng, 1991,113:189

74. Vukicevic S, Paralkar VM, Cunningham NS, et al. Autoradiographic localiation of osteogenin binding sites in cartilage and bone durng rat embryonic development. Dev Biol, 1990,40:209～214

75. Vakicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major situes for synthesis of bone morphogenetic protein-3(Osteogenin). J Histoche Cytoche, 1994,42:869～873

76. 丁焕文，何炀煌. 碱性成纤维细胞生长因子的生物学功能. 中华创伤杂志，1995,11(3):189～191

77. 郝建军综述. 成纤维细胞生长因子家族的研究进展. 牙体牙髓牙周病学杂志,1994,4(2):111

78. 郝建军. 激素和生长因子与牙乳头细胞、牙髓细胞、牙胚分化和矿化关系的体外实验研究. 西安：第四军医大学博士学位论文，1997

79. SΦren Blom, Palle H, Erik D. A comparison of the efect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology. J peridontal, 1994,65:373～378

80. Dimitrios J. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol, 1995,39:281～29

81. Frenz DA, Liu W, Wiliams JD, et al. Induction of chronogenesis: requirement for synergistic interaction of fibroblast growth factor and transforming

growth factor-beta. Development, 1994,120:145

82. Nakashima M. The effect of growth factors on DNA synthesis. proteoglycan synthesis and alkaline phosphatose activity in bovine dental pulp cells. Arch Oral Biol, 1992,37(3):231～236

83. Young WG. Growth hormone and insulinelike growth factor-1 in odontogenesis. Int J Dev Biol, 1995,39:203～272

84. Rach JV, Lesot H, Begne-kirn C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol, 1995,39:51～68

85. 吴海珍，文玲英. 正常、炎症牙髓中内皮细胞和 von Willebrand 因子. 牙体牙髓牙周病学杂志，1993,3(3):158～160

86. Alberto M, Elisabetta D. Cytokines as communication signals between leukocytes and endotheial cells. Immunology Today, 1989,10(11):370～375

87. Pober JS, John D, Christro phen CW, et al. The potential role of vascular endothelium in immune reactions. Human Immunology, 1990,28:258～262

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第六章　牙髓的神经和神经肽

牙髓神经为末梢神经，很丰富，它来自牙槽神经的分支并伴同血管自根尖孔进入牙髓，然后分成很多细的和更细的分支，呈放射状分散至成牙本质细胞层。在靠近多细胞层时神经纤维形成网状，称为神经壁层(Parietal layer of nerves)。而后，神经轴突继续通过多细胞层和乏细胞层，止于牙髓-牙本质界处的成牙本质细胞突起之间或牙本质小管内，感受外界刺激。

牙髓组织中有躯体感觉神经和自律神经两类神经纤维。牙髓的躯体感觉神经起源于三叉神经节，上颌牙经由上颌神经进入牙髓，下颌牙经由下颌神经进入牙髓。一般可分为有鞘的 A 类纤维和无鞘的 C 纤维，A 类纤维根据直径又分为 $A\beta$ 和 $A\delta$。$A\delta$ 纤维为快传导，低刺激阈，被轻的温度、机械和渗透性等刺激而激活，对缺血敏感，可迅速丧失其活性，对热刺激反应为即刻的尖锐痛。C 纤维为慢传导，高刺激阈，被热或应用速性激肽和组织胺而激活，对热刺激反应为延迟的钝痛，对缺血较不敏感，维持功能的能力长于 $A\delta$ 纤维。牙髓的 A 纤维和 C 纤维共同担负着牙髓的感觉功能。牙髓的自律神经为交感神经。其交感神经起源于颈上神经节，由两条途径进入牙髓：一条是交感神经离开颈上神经节后，依次环绕上下齿槽动脉进入上下颌牙齿，这是交感神经进入牙髓的主要通路。Mattews 等通过电生理方法，Marfurt 等通过神经解剖方法

均证实了少量交感神经纤维从颈上神经节走向三叉神经节，伴随感觉神经进入牙髓，因而，下齿槽神经中既有躯体感觉神经又有交感神经；Tonder等也应用电生理方法证实了这一推论。

牙髓中的交感神经来自颈上神经节，而副交感神经节至牙髓的神经通路目前尚未被组织学证实。

神经肽(Neuropeptides)是体内传递信息的多肽，主要分布于神经组织内，也分布于其他组织中。同一种神经肽按其分布不同可能起递质(Modulator)或激素(Hormone)样作用。有些神经肽已被确认是递质，但神经肽所参与的神经活动远较经典递质广泛而复杂。近年来，通过免疫细胞化学方法证实牙髓中有多种神经肽存在，这些神经肽可能参与了牙髓的血流调节、疼痛传导，炎症和修复等病理生理过程。

第一节　神经递质和神经肽

神经递质是含在神经细胞和它们的胞浆突中的物质。神经受到刺激，这些物质可从神经末梢释放，并在相邻细胞间发生神经传递。经典的神经递质既可在轴突末梢合成，也可在胞体合成经轴浆运输到轴突末梢以囊泡形式贮存备用。多数经典递质还能在完成使命后被轴突末梢重新摄取，再利用。神经元之间的信号传递主要发生在突触部位，突轴传递的中心环节必须有神经递质参与。

神经调节物(Neuromodulator)或神经调质(Neuroregulator)是与神经递质有相似的特征，但在突触传递中只起到辅助作用的一些物质。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

神经肽是一种包含在神经系统中的多肽，与经典递质不同，必须在胞体合成，经轴浆运输后到达末梢，并以囊泡形式贮存备用。一些作为神经递质，更多的则作为神经调节物。

近十多年来神经生物学领域中最重要的进展之一是对神经肽的研究。P 物质(Substance P,SP) 及降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-relafed peptide, CGRP)同属神经肽类，其神经末梢中枢端止于脊髓背角，外周端止于内脏器官和皮肤粘膜等组织。SP 和 CGRP 亦存在于大多数的口腔组织中，在牙髓中含量相当高。

一、SP 的生物学特性、分布和生理作用

1. SP 的生物学特性

SP 是最早发现的神经肽之一。1931 年 von Eulen 和 Graddum 从脑组织和肠内提取一种收缩平滑肌和降低血压的物质，取名为 P 物质，1971 年阐明其结构为 11 肽。目前 SP 前体已用重组 DNA 技术克隆成功，发现其有两种前体，一种仅含 SP 片段，称为 α 前速激肽原(α-Preprotachykinin)；另一种同时含有 K 物质(SK)片段，称为 β 前速激肽原(β-Preprotachykinin)；天然的 P 物质是含有 11 个氨基酸残基的直链多肽，分子量在 1 000～2 000 之间，人工合成的 P 物质肽链长短不一，生物活性也不同。

2. SP 的分布和生理作用

SP 由神经细胞和胃肠内分泌细胞产生并分泌，广泛分布于中枢神经系统和周身各组织器官。在脑中以黑皮质浓度最高，其次为下丘脑视前区和脑干等处。在脊髓背角及脊神经节中含量亦相当多。交感、副交感及胰腺神经中亦可见有 SP 神

经细胞。在口腔组织SP分布于牙髓、牙周和味蕾等处。

已证明SP是脊髓初级传入神经之中的一种传递痛觉的神经递质，在感觉神经初级传入纤维中的C纤维含量较高，用辣椒辣素损伤动物感觉神经中的C纤维后，SP含量明显减少，使动物对痛的敏感性降低。SP可增加毛细血管通透性，并导致肥大细胞释放组织胺。因此，C纤维中的SP可能起双重作用，传递信息到中枢，同时参与局部炎症过程。

二、CGRP的生物学特性、分布和生理作用

1. CGRP的生物学特性

1981年，Craig等发现，人降钙素(Calcitonin，CT)前体蛋白两侧存在着生物学意义未知的隐肽(Cryptic peptide)。1982年，Amara等发现，CT基因可产生两种不同的信使核糖核酸(mRNA)，分别合成CT类激素和一种新肽，由于其来源和CT基因相关，故称为降钙素基因相关肽。以后，他又与Rosenfeled等一起用重组DNA和分子生物学技术分离了CGRP。Morris和Steenbergh等同时首次从人甲状腺髓样癌组织中分离出CGRP，并利用快原子轰击质谱仪确定了它的氨基酸组成和顺序，这一工作不仅证实了CGRP的存在，而且进一步证明了人类也存在CGRP。已知CGRP为37肽，其N端有一2,7双硫键，C端有一酰胺基。在人类和大鼠均存在另一种形式的CGRP，分别称为α-CGRP和β-CGRP。

2. CGRP的分布和生理作用

应用免疫细胞化学和放射免疫测定证明CGRP广泛分布于中枢和外周神经系统及某些非神经组织中。在中枢神经系统CGRP免疫反应性(CGRP-immunoreaetivity，CGRP-

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

IR)神经细胞和纤维几乎见于中枢各部。在外周神经系统中，外周神经节的 CGRP 可分为两组，一组位于感觉神经节内；另一组位于自主神经节内。CGRP-IR 细胞可不含或同时含一至数种其他神经肽。在器官组织中，CGRP-IR 纤维分布于心脏和全身血管，以冠状动脉和器官中的小血管为多，动脉较静脉丰富。在颈动脉分叉处，呼吸道管壁平滑肌和上皮内分泌细胞、胃肠道、膀胱、子宫等处均有 CGRP 分布。在口腔组织中 CGRP 分布于舌、味蕾、牙髓、牙周组织，如结合上皮和根尖韧带处等。CGRP 等与 SP 的分布状态相似，它们之间可能有极密切的功能关系。

CGRP 参与感觉的调节，还参与运动、行为、胃肠道和心血管的调节。周围给予 CGRP 会引起心动过速和血压下降，且伴有血管尤其是微血管的强烈扩张，人们认为 CGRP 可能是目前所发现的最强的一种血管扩张剂，主要作用于小血管平滑肌，从而调节血流。CGRP 与神经源性炎症反应中的血管通透性增加有关，它能增强缓激肽(Bradykinin)所致的血管通透性增加作用，促进 SP、神经激肽 A 和 B(Neurokinin A and B)的血管外渗作用。

神经肽的发现使神经科学研究掀起了一个新高潮。有些神经肽已被确定是递质，但它所参与的神经活动远较经典递质广泛、复杂，几乎每一个生理或病理过程都有神经肽参与。

第二节　牙髓中的神经肽

牙髓中的神经肽含量相当高，应用免疫细胞化学、去神经支配及辣椒辣素预处理等一系列研究证明这些神经肽存在于

牙髓内感受伤害的传入神经纤维内。

一、牙髓感觉神经中的神经肽

至今，在牙髓中发现了来源于三叉神经节的三种神经肽：P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)和神经激肽A(Neurokinin A，NKA)。SP是第一个在牙髓中发现的神经肽。已证实P物质样免疫反应性(SP-like immunoreactivity，SP-LI)纤维存在于猫的牙髓及生长的鼠牙中。通过放射免疫测定法在人牙髓中亦发现SP-LI纤维的存在，但不是所有的神经纤维都是SP-LI纤维。含SP的神经纤维与大的血管一起成束地通过根尖孔进入牙髓，在根髓中可见许多含SP神经纤维沿血管周围分布，其中一些在大血管壁附近呈网状分布，而并非所有血管都与含SP神经纤维伴行，也不是所有含SP的神经纤维都沿血管周围分布，一些含SP神经纤维与血管无明显关系。在成牙本质细胞下层，单条的含SP神经纤维可发出分支并从成牙本质细胞之间穿过伸向前期牙本质和牙本质。在人磨牙，含SP神经纤维进入前期牙本质后呈不同的分布方式，一些纤维直接穿过前期牙本质进入牙本质；另一些纤维在前期牙本质中横向行走。鼠磨牙中，观察到含SP的神经纤维可进入牙本质约20μm。当切断下齿槽神经后，牙髓中含SP的神经纤维全部消失，但切除颈上神经节对其分布无任何影响，可以推论含SP的神经纤维起源于三叉神经节。

CGRP是在牙髓中发现的另一种神经肽。含CGRP的神经纤维呈束状进入根尖孔，并分布于整个牙髓。许多含CGRP的神经纤维沿血管周围分布，另一些则远离血管。在冠部牙髓，CGRP和SP神经纤维沿着一些血管分布，但未见这些纤

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

维进入平滑肌层。含CGRP的神经纤维也存在于成牙本质细胞下层并进入前期牙本质和牙本质。在人牙髓中的细小、弯曲的CGRP和SP神经纤维位于贯穿牙髓的神经细丝纤维束中。通常一个神经纤维束内仅有1～2条CGRP或SP纤维，有许多神经纤维束则不含这些纤维。连续的组织切片发现，一些SP神经纤维的分布与神经细丝纤维无关。切断下齿槽神经可导致牙髓中含CGRP的神经纤维完全消失，提示含CGRP的神经纤维属感觉纤维，起源于三叉神经节。

SP和CGRP同属于牙髓内感觉性神经肽。最近，采用免疫组织化学方法研究了正常人牙牙髓的P物质免疫反应性(SP immunoreactive，SP-IR)和降钙素基因相关肽免疫反应性(CGRP immunoreactive，CGRP-IR)神经纤维的形态和分布特征，结果表明它们均为纤细、弯曲的串珠样纤维，根部牙髓中CGRP-IR神经纤维大多与血管伴行，呈束状从根尖孔进入牙髓，而SP-IR纤维在根髓中大多排列稀疏，呈"S"状弯曲，多在血管周围分布。冠部牙髓中的SP和CGRP纤维有些在血管周围呈网状分布，有些则与血管无明显关系。它们在成牙本质细胞下层形成网状结构，并有细小分支穿过成牙本质细胞之间进入前期牙本质和牙本质中，但SP神经纤维的分支极少进入矿化的牙本质中。CGRP神经纤维仅进入不同深度的牙本质中，而未见其越过釉牙本质界，并且人牙髓中CGRP神经纤维较SP多，表明二者的分布并不呈交错重叠。

NKA是最近在牙髓中发现的一种神经肽。NKA和SP同属于快激肽类(Tachykinin)，NKA的前体和SP的某些前体相同。在整个牙髓中均可见到含NKA的神经纤维，其分布与含SP的神经纤维相似。切断下齿槽神经后，牙髓中含

NKA 的神经纤维全部消失，而切断交感神经对其分布和数目无影响。因而，含 NKA 的神经纤维也起源于三叉神经节。

CGRP 和 SP 的免疫双染色发现：二者的分布非常相似，可存在于同一神经纤维中。SP 和 NKA 的分布也十分相似，两种神经肽也可存在于同一神经纤维中。所以，SP、CGRP 和 NKA 三种神经肽似乎都可存在于同一种神经纤维中。

二、牙髓交感神经中的神经肽

儿茶酚胺是交感神经中的神经递质。在牙髓中所有含儿茶酚胺的神经纤维都围绕在血管周围。多巴胺 β-羟基化酶(Dopamine-β-hydroxylase，DβH)是儿茶酚胺合成酶之一，DβH 免疫细胞化学染色显示含 DβH 的神经纤维围绕在血管周围，但并非所有血管都有含 DβH 的神经纤维围绕。Uddman、Edwall 等发现牙髓中含有神经肽 Y(Neuropeptide Y，NPY)；含 NPY 的神经纤维和含 DβH 的神经纤维分布很相似，也存在于牙髓血管周围，但不存在成牙本质细胞中。DβH 和 NPY 共存于牙髓神经中。切断一侧颈上神经节，则同侧牙牙髓中含 NPY 的神经纤维全部消失，提示牙髓中含 NPY 的神经为交感神经，起源于颈上神经节。

三、牙髓副交感神经中的神经肽

血管活性肠多肽(Vasoactive intestinal polypeptide，VIP)是哺乳动物牙髓中的另一种神经肽。含 VIP 的神经纤维也成束状进入牙髓，主要分布在血管周围，并在血管壁周呈网状排列。VIP 和 SP 免疫双染色发现有些血管可同时与含 VIP 的神经纤维和含 SP 的神经纤维伴行。牙髓中含 VIP 的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

神经纤维的数目多于含 NPY 的神经纤维数,而伴血管的含 VIP 的神经纤维则远多于血管的 NPY 的神经纤维数。在牙髓的切端,很多弯曲的 VIP 纤维直人切缘而不与血管联系。在成牙本质细胞层未发现含 VIP 的神经纤维,在成牙本质细胞层下方则有很少的含 VIP 的神经纤维。切断下齿槽神经和交感神经均不会影响牙髓中含 VIP 的神经,故推测含 VIP 的神经纤维来源于副交感神节。但至今,牙髓中是否存在副交感神经尚无定论。

第三节　牙髓神经肽的生物学功能

牙髓神经肽的生物学功能主要表现在参与血流调节、疼痛传导以及免疫调节、炎症介导和修复过程。

一、参与血流调节

正常牙髓 SP 阳性神经纤维的分布与 CGRP 非常相似,只是前者较细而稀疏。牙髓中含有 SP、CGRP 的神经纤维都可能参与牙髓血流的调节。SP 有舒张血管作用,可增加毛细血管的通透性,导致血浆外渗,刺激单核细胞释放细胞因子和肥大细胞释放组织胺。SP 对牙髓血流的调节作用可能是双向的,开始导致血流量增加,随后使血流量持续减少。CGRP 则可能是目前所发现的最强的一种血管扩张剂,它与神经源性炎症反应的血管通透性增加有关,它能增强缓激肽所致的增加血管通透性的作用,并促进 SP 神经激肽 A 和 B 的血管外渗作用。给下齿槽动脉内分别注人 SP 或 CGRP 后均引起了牙髓血管扩张,二者同时注入所引起的血管扩张要大于二者

先后注入的叠加效应。Johan，Luthman 等研究发现，尽管含 SP 和 CGRP 神经纤维沿着血管的四周分布，但未见这些纤维进入血管的平滑肌层，因而，SP、CGRP 对牙髓血管作用机理目前仍不十分清楚。

二、参与疼痛传导

炎症性痛过敏是一个由多种因素参与的复杂的病理生理过程。目前认为牙髓的痛觉感受器有 A δ 纤维和 C 纤维的自律神经末梢。牙髓炎症性痛过敏主要是由于炎症或神经损伤后，局部组织释放多种体液介质作用于无髓神经纤维末梢，使其对刺激的反应性增强所致。其中一些重要的体液介质，如 BK、PGs 及吗啡等在发挥作用时，均与 Ca^{2+}有密切关系。在人牙髓炎症性痛过敏状态下神经纤维内 Ca^{2+}浓度变化研究中直接测定了人牙髓炎症性痛过敏状态下牙髓神经纤维内 Ca^{2+}的浓度，发现炎症性痛过敏的牙髓，其神经纤维内 Ca^{2+}浓度均显著高于正常牙髓，推测牙髓神经纤维内 Ca^{2+}浓度增加可能与其痛觉感觉器的炎症过程有关，增加的 Ca^{2+}可能来源于细胞外液 Ca^{2+}的跨膜内流。因此，Ca^{2+}在炎症性痛过敏的作用是通过 Ca^{2+}的跨膜通道内流而实现的。由于 Ca^{2+}在细胞内的生物学效应主要是通过与钙调蛋白（Calmodulin，CaM）结合而发挥的，Ca^{2+}在炎症性痛过敏的外周和中枢机制中是一个重要因素。

以角叉莱胶作为致炎物质，三叉神经脊束核尾侧亚核神经有无 C-fos 表达作为检测牙痛的客观指标，建立了牙髓神经急性痛过敏模型。结果无论是急、慢性炎症，牙髓中 SP 和 CGRP 均有明显增多，它们都参与了疼痛的传导。它们参与疼

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

痛传导的机理可能是，一方面SP和CGRP直接作用于神经纤维导致其胞膜去极化，感觉性升高；另一方面，SP和CGRP有舒张血管的作用，使牙髓内压力持续升高，引起牙髓神经痛过敏。此外，由于SP和CGRP可相互加强其血管舒张作用，可在一定的外界刺激条件下使牙本质渗出，根据牙本质痛觉传递的流体动力学说，分布于前期牙本质及牙本质的SP或CGRP神经纤维很可能参与了痛觉的传递。尤其在炎症过程中，一些炎症介质如组织胺、5-羟色胺、激肽、前列腺素和神经肽等亦有可能通过降低SP和CGRP神经纤维的兴奋阈值而直接引起疼痛，或靠血管舒张和血浆外渗作用，使髓腔内压力增高而间接引起疼痛。

目前已知牙髓炎症时组织不仅产生缓解肽(BK)等内源性致痛物质，还可产生脑啡肽(EK)等内源性镇痛物质。总之SP或CGRP神经纤维是代表牙髓内感觉神经纤维的一个亚群，除了具有感觉功能外，还具有 重要的输出功能，在牙髓组织内可起到双相的调节作用。

三、参与免疫调节、炎症介导和修复过程

1. 参与免疫调节

在众多神经肽中，对SP的免疫调节效应研究最为广泛和深入。SP影响所有的免疫细胞。

(1)SP有可能是T细胞的丝裂原或辅助丝裂原，它有剂量依赖性的促进淋巴细胞增殖效应，并加强ConA及PHA的刺激反应，不依赖受体介导亦能升高人T细胞内Ca^{2+}浓度。

(2)SP促进B细胞分泌Ig，尤其对IgA合成的影响最明显，参与调节局部免疫。

(3)SP 既能促进单核-巨噬细胞的吞噬和趋化游走活性，又可刺激其氧化爆发反应(Oxidative burst reaction)，促进多种介质的释放，且所需的 SP 浓度较低。能促进人外周血单核细胞 IL-1、IL-6 及 TNF-α 释放，IFN-γ 的合成与分泌等；间接地调节 MΦ 与 T 细胞间的识别、抗原加工递呈等过程。

(4)SP 在生理浓度即可刺激人多形核白细胞的趋化运动，明显增强 C_{5a} 所致的中性粒细胞趋化、游走运动及吞噬杀菌活性。SP 还可通过肥大细胞而促进粒细胞的浸润。

(5)SP 具有刺激肥大细胞释放组织胺的效应。肥大细胞能表达及分泌许多细胞因子，如 TNF-α、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6 和 GM-CSF 等。SP 则选择性地促进肥大细胞表达 TNF-α mRNA 及释放 TNF-α，它对肥大细胞的影响与过敏疾病的发生和发展有密切关系。

(6)SP 促进成纤维细胞、滑膜细胞等结缔组织细胞的增生，并协同 IL-1 的致成纤维细胞增殖活性，并可刺激其释放胶原酶及 PGE_2。此外，SP 诱发肥大细胞分泌组织胺，从而引起血管扩张、血浆外渗及炎性细胞浸润，导致局部充血水肿。SP 作为一种炎性介质参与重要的免疫疾病病理过程。

2. 参与炎症介导

SP 和 CGRP 在受到刺激后可从其神经末端释放出来，启动或调节炎症过程，参与炎症介导。例如：

(1)当牙髓受到各种理化因素的刺激如导致髓腔内的压力增高时则是以激活牙髓中的 C 纤维，引起 SP、CGRP 等神经肽的释放而对牙髓的炎症过程产生影响。同时，牙髓的 C 纤维还是被一些炎症介质如缓激肽和组织胺所激活。这样，在不同刺激作用下神经肽源性的感觉神经纤维即可释放 SP、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

CGRP 等神经肽进入组织，从而发挥重要的输出作用，在牙髓中可能参与即刻的防御反应。

(2)研究发现，淋巴细胞表面具有与 SP 特异性结合的受体。SP 与受体结合后可促进 T 淋巴细胞的增殖。SP 还可加强巨噬细胞的吞噬活性和多形核白细胞的趋化性，以启动和调节炎症过程。

(3)Moore 等还把 SP 输入到绵羊的淋巴结中，发现该淋巴结输出小淋巴细胞和淋巴母细胞增多，认为 SP 具有免疫促进效应。在牙髓受到各种理化因素刺激或暴露于口腔之后，则可能由免疫防御到免疫病理损害。

3. 参与修复过程

炎症和修复过程是紧密联系的，SP 和 CGRP 参与修复过程的研究有：

(1)在皮肤移植实验中发现，CGRP 可明显增加带状或岛状皮瓣的存活；相反，用神经毒、辣椒辣素预先处理动物后，在导致 CGRP 和 SP 降低的同时，皮瓣的存活率亦明显降低。该结果表明，释放进入受伤组织中的神经肽确实有助于愈合过程，而且对正常的愈合反应似乎是必需的。

(2)Nillson 研究发现，SP 能刺激培养的动脉平滑肌以及人皮肤成纤维细胞的 DNA 合成，通过专一的速激肽受体帮助其他促有丝分裂剂，如血小板衍生生长因子(Platbet-derived growth factor，PDGF)刺激周围结缔组织细胞增殖。

(3)SP 和 PDGF 能刺激 4,5-二磷酸-磷酯酰肌醇水解为甘油二酯和三磷酸肌醇，而三磷酸肌醇具有动员细胞内钙的第二信使作用，这种作用参与细胞增殖的调节，使创伤即时修复。

Hegerstrand 研究发现，在人内皮细胞膜上有特异的 CGRP 受体，CGRP 可明显促进人内皮细胞的增殖和^{3}H 胸腺嘧啶核苷掺入，同时 CGRP 可刺激细胞内环腺苷酸的生长而对磷酸肌醇无明显影响。由此推测，CGRP 可通过特异的受体，刺激人内皮细胞内环腺苷酸的生成而促进细胞的增殖活动。CGRP 对于生理和病理状态下，如炎症和创伤愈合等的血管再生可能具有重要意义。

4. 参与牙髓的炎症和损伤修复

有关 SP 和 CGRP 神经纤维在牙髓炎症，损伤、牙齿移植和牙胚生长发育过程中的分布、含量、超微结构等生理、病理变化特性方面的内容已进行了许多实验研究，研究表明，SP 和 CGRP 与牙髓的炎症和修复过程密切相关。例如：

(1)Toylor 研究发现，鼠牙髓轻度损伤后，在未见炎细胞浸润或结缔组织明显损害之前，损伤区的下方则可见 CGRP 神经纤维的生长，表明感觉性神经纤维的生长是牙髓对损伤作出反应的一个重要环节。而中度损伤后 4 天，牙髓血管扩张，出现急性炎症，损伤区周围的 CGRP 神经纤维数量随之增加。损伤后 7 天，急性炎症已不明显，损伤区边缘修复性牙本质开始形成，其周围亦有大量的含 CGRP 神经纤维分布。11～35 天，损害区逐渐被修复性牙本质代替，CGRP 的分布亦逐渐接近正常，CGRP 神经纤维沿着正在愈合的损伤部位边缘和修复性牙本质四周分布，这是它在牙髓组织愈合过程中的作用表现。

机械性和感染性的损伤对鼠磨牙牙髓腔内 SP、CGRP 神经纤维影响的研究表明，牙髓中的 SP、CGRP 的含量可因受不同的损伤而发生变化，它们的反应不是一成不变的，而是根

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

据损伤的类型和程度的不同而不同。

（2）Krinnsland 在移植牙的实验中发现，牙齿移植后，CGRP、SP 神经纤维的再生是与纤维结缔组织的再生以及牙髓、牙周组织修复同时发生的。术后在不能形成修复性牙本质的移植牙中，其根髓未见正常的神经血管束形成，含 CGRP 神经纤维数量也明显减少，表明新生牙髓中含 CGRP 神经纤维的数量与组织形成修复性牙本质的能力有关。

（3）近年，采用免疫细胞化学方法对正常人牙髓和程度不同的龋病牙牙髓中的 SP 和 CGRP 神经纤维的分布特征及其动态变化进行了研究，从而探讨它们在人牙牙髓炎症和修复过程中的可能作用，结果，在龋病牙髓中，当牙齿发生初龋时，成牙本质细胞出现轻微损害，牙髓组织内有少量炎细胞渗出，同时 SP、CGRP 神经纤维亦发生数目增多，染色加深的相应变化；中龋时，成牙本质细胞进一步受累，牙髓组织内有较多的炎细胞渗出，SP、CGRP 神经纤维明显增多，染色加深和增强，并在龋病下方的成牙本质细胞层形成明显的神经丛，有许多细小的分支越过成牙本质细胞层向着龋病方面延伸，表明此阶段的 SP、CGRP 神经纤维的反应性变化极为明显，此种反应性增强变化导致了大量的 SP 免疫反应性（SP-IR）和 CGRP 免疫反应性（CGRP-IR）物质释放进入牙髓组织内。

深龋或深龋并慢性牙髓炎症时，炎症区域中的 SP-IR 神经纤维染色强度明显减弱，而 CGRP-IR 神经纤维染色强度明显增强，在脓腔四周出现聚集和包绕现象，说明它们在局限炎症和促进组织愈合方面起着重要作用。以上结果证实人牙龋病牙髓内的 SP 和 CGRP 神经纤维并不是一成不变的，它们在受到龋病的刺激之后呈明显的动态变化，而在深龋或牙

髓炎症时，SP、CGRP 神经纤维都呈不同的反应方式。

SP 和 CGRP 的免疫双染色发现，正常状态下的 SP 分布，与 CGRP 非常相似，只是 SP 的阳性纤维纤细，数量较少。在炎症状态下，SP 的变化没有 CGRP 明显，因而，SP 的作用可能较 CGRP 为小。

牙齿是具有活力和新陈代谢的器官，且与机体有着密切的联系，因此，在龋病的发生、发展过程中，始终存在着破坏和修复的交替过程。其中，牙髓内的 SP、CGRP 神经纤维在牙髓中起到双相调节作用，它们在受到刺激后可以从其终末端释放出来，将信息传递到中枢，启动或调节炎症过程，同时又参与组织的修复。由此可见，龋病牙髓中的 SP、CGRP 神经纤维处于动态变化之中，此动态变化是它们参与牙髓防御反应或炎症反应的象征，因而亦进一步为牙髓炎症在很大程度上是神经源性所介导的炎症提供了依据。

与此同时，在临床应用方面，是否可采用缓慢释放神经肽的作用性药物作为深龋衬里的一部分或作为直接或间接盖髓药物的一个组成部分，调节神经肽对组织损伤的反应，以便为治疗牙髓损伤提供一种新的方法。

牙髓神经生物学是牙髓生物学的一个重要部分。目前关于牙髓神经生物学的研究领域已涉及牙胚发育、痛觉机理、牙髓微循环的调节以及牙髓炎症和修复等一系列生理和病理过程。已探讨了牙胚中的 SP 和 mRNA 编码的 SP 受体表达；神经生长因子受体在牙胚间充质组织的表达及其与成牙本质细胞分化的关系等。但是，关于牙髓中的神经肽，以及它们在牙髓损伤、免疫调节、炎症和修复过程之间的相互作用及作用机制等尚需从多方面深入研究。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

主要参考文献

1. 陈兆聪主编. 医学分子生物学. 武汉：武汉大学出版社，1987
2. 张殿明，徐隆绍主编. 神经内分泌学. 北京：中国医药科技出版社，1991
3. 吴康. 降钙素基因相关肽的研究. 生物学进展. 1989,20:57
4. 曹志中. 牙髓炎性痛过敏机制的实验研究. 西安：第四军医大学博士学位论文，1995
5. 刘军. 正常及龋病牙髓中 SP 和 CGRP 的分布特征和动态学变化研究. 西安：第四军医大学硕士学位论文. 1995
6. 邱一华，王健鹤. 神经递质和神经肽对免疫功能的调节. 生理科学进展，1991,22:75
7. Kin S. Neurovascular interactions in dental pulp in health and inflammation. J Endodon. 1990,16:48～53
8. Byers M, Talor P, Khayat B, et al. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. E Endodon, 1990,16:78～84
9. Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: *distribution origins*, and correlation. J Endodon, 1990,16:67～69
10. Mattews B, Robinson PP. The course of postganglionic sympathetic fibers distributed with the trigeminal nevre of the cat. J physiol, 1980,303:391～401
11. Tonder KH, Nass G. Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs. Acta physiol scand, 1978,104:13～23
12. Grutiner E, Gurry M, Hargreaves K, et al. Effect of injury on pulpal levels of immuroreactive substance P and immunoreactive calcitonin generelated peptide. J Endodon, 1992,18:553
13. Wakisaka S, Nchikawa H, Nishimoto T, et al. Substance P-like immunoreactivity in the pulp-dentin zone of human molar teeth demonstrated by indireet immunofluorescence. Arch Oral Biol, 1984,29:73～75
14. Kim S. Pulpal inflammation resulting from restorative procedures has a neurogenic inflammation. J Dent Res, 1991,70:451

15. Olgart D, Hokfelt T, Nilsson G, et al. Localization of substance P- like immunoreactivity in nerves in the tooth Pulp. Pain. 1977,4:153
16. Wakisakas, Ichikawa H. The distribution and origin of calcitonon gene-related peptide-containing nerve fibers in feline dental pulp. Histochemistry, 1987,86:585～589
17. Gronblad M, Liesi P, Munch AM, et al. Peptidergic nerves in human tooth pulp. Scand J Dent Res, 1984,92:319
18. Gazelius B, Edwall B, Olgart L, et al. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and, substance P in sensory nerves of cat dental pulp. Acta physiol Scand. 1987,130:33
19. Lang E, Novak A, Reeh PW, et al. Chemosensitioty of fine afferents from rat skin in vitro. J Neurophysiol, 1990,63:887
20. Trowbridge HO. Intradental sensory units: Physiological and clinical aspects. J Endodon, 1985,11:489
21. Luthman J, Luthman D. Hokfelt T: Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. Arch Oral Biol, 1992,37: 193
22. Edwall B, Gazelius. Fazekas A, et al. Neuropeptide Y(NPY) and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. Acta physiol Scand, 1985,125:253
23. Casasco A, Calligaro A, Casasco M, et al. Peptidergic nerves in human dental pulp. Histochemistry, 1990,95:115
24. Gazelius B, Olgart D. Vasodilatation in the dental pulp prooluced by electrical stimulation of the inferior alveolar nerve in the cat. Acta physiol scant, 1980,108:181
25. Gazelius B. Edwall B, Olgart L, et al. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide(CGRP) and substance P in sensory nerve of cat dental pulp. Acta physiol scan, 1987,130:33
26. Luthman J, Luthman D, Hokfelt T. Occulrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. Arch Oral Biol, 1992,37: 193

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

27. Olgart L, Edwall B, Gazelius B. Neurogenic mediators in control of pulpal blood flow. J Endod, 1989,15:409

28. Nillson J, Von Euler A, Dalsguard C-J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature,1985,315:61

29. Hegerstrand A. Dalsgaard C-J, Jonzon B, et al. Calcitonin gene- related peptide stimlates proliferation of human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci, 1990,187:3299

30. Margreaves K, Bowles W. Regulation of the release of CGRP-like immunoreactivity from dental pulp. J Endodon, 1992,18:189

31. Torneck C. Changes in the fine structure of the human dental pulp subsequent to carious exposure. J Oral Pathol, 1977,6:82

第七章　牙髓的免疫应答

免疫(Immune)是机体通过识别和排除抗原性异物、维持机体内环境稳定的一种特异性生理反应。机体的免疫功能是在淋巴细胞、单核细胞和其他有关细胞及其产物的相互作用下完成的。免疫系统是这些具有免疫作用的细胞及其相关的组织和器官构成的。因此，免疫系统的生理功能首先就是识别自己和异己抗原分子，并对它们产生相应的反应。

免疫应答(Immune response)是抗原分子选择性刺激能识别它的特异性淋巴细胞，从而触发淋巴细胞自身活化、增殖、分化以及产生免疫效应的生理过程。抗原特异性淋巴细胞具有识别抗原分子的功能，这种功能是在遗传基础上于个体发育过程中形成的。抗原分子具有选择和触发抗原特异性淋巴细胞的作用，这种作用是机体免疫应答的动因。

免疫反应是指免疫应答过程中所产生的抗体和致敏淋巴细胞与相应抗原特异性结合所发生的一系列反应。

第一节　免疫应答的类型和产生场所

一、免疫应答的类型

一般情况下，免疫应答是机体免疫系统执行防卫功能的生物学过程，但在此种免疫保护的生物学活动中，也可能导致

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

免疫损伤。因而，根据机体的免疫遗传和在内外因素影响下所出现的免疫反应，可将免疫应答分为两大类。

1. 正常免疫应答

正常免疫应答是一种生理性免疫应答，是机体免疫系统在功能正常情况下对异己抗原表现出维护机体相对稳定性，发挥免疫监视和免疫保护作用的生理过程。例如抗感染免疫和抗肿瘤免疫等。

2. 异常免疫应答

异常免疫应答是一种病理性免疫应答，是指机体免疫系统在功能异常情况下对异己抗原或自身抗原表现出过高或过低的反应，过高表现为超敏反应(Hypersensitivity reaction)和自身免疫性疾病，过低表现为反复感染和易发生肿瘤等。对异己抗原无反应者为免疫缺陷。超敏反应、自身免疫性疾病和免疫缺陷均是对机体不利的免疫应答，属于免疫病理。

免疫应答所产生的反应或是对机体有利的免疫反应，或是出现对机体组织有损伤的超敏反应，前者是生理性防御反应，后者是病理性功能紊乱。通常，超敏反应、变态反应(Allergy)和免疫损伤(Immune injury)为同义词。

二、免疫应答的产生场所

在免疫应答中，单核吞噬细胞系统和淋巴细胞系统的协同作用是特异性免疫应答产生的物质基础；而周围淋巴器官，特别是淋巴结和脾脏，则是免疫应答产生的主要场所。

进入机体的抗原或进入血液的抗原，通过淋巴循环进入引流区的淋巴结，或被滞留于脾脏，并被淋巴结和脾脏的巨噬细胞或其他抗原递呈细胞，如树突状细胞等摄取；而后，抗原

递呈细胞将加工后的抗原再表达于细胞表面。与此同时，血循环中的成熟 T、B 细胞经由淋巴组织中的毛细血管进入淋巴器官，并与其中相对应的抗原特异性淋巴细胞和抗原递呈细胞膜上表达的抗原接触后，再被活化、增殖和分化成为效应细胞。免疫应答的最终效果是产生体液免疫和细胞免疫。

第二节　免疫应答的过程

免疫应答是一个相当复杂的过程，由单核吞噬细胞系统和淋巴细胞系统协同完成，并依据介导效应的主要免疫细胞不同而分为 B 细胞介导的体液免疫和 T 细胞介导的细胞免疫。但在实际的免疫应答产生过程中，体液免疫和细胞免疫往往是相互伴随、相互联系和相互影响的。

一般将免疫应答过程分为三个阶段：感应阶段、反应阶段和效应阶段。

一、感应阶段

感应阶段(Inductive stage)是免疫细胞对抗原分子的识别，或抗原分子与免疫细胞相互作用的阶段。此阶段主要包括抗原递呈细胞对抗原的摄取、加工与递呈，以及抗原特异性淋巴细胞对抗原的识别等。

1. 抗原递呈细胞

抗原递呈细胞(Antigen presentine cell，APC)是一类能够摄取和处理抗原、并能将处理后的抗原递呈给淋巴细胞，并致使淋巴细胞活化的细胞，抗原递呈细胞也称为辅佐细胞(Accessory cell，AC)。血液中的大单核细胞和组织中的巨噬

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

细胞是典型的抗原递呈细胞，抗原经巨噬细胞处理之后，其免疫原性可大大提高。此外还有树突状细胞、并指状细胞和朗罕细胞等。而且B细胞也具有递呈抗原作用，尤其是活化的B细胞，其抗原递呈能力与巨噬细胞相仿。B细胞可凭借膜表面免疫球蛋白(SmIg)特异性地捕获抗原，这一优越性在递呈低浓度的可溶性抗原时表现得尤为明显。

构成抗原递呈细胞的条件是：①能够捕获、摄取和处理抗原；②能将处理后的抗原片段再表达到细胞表面；③细胞膜表面的MHC-Ⅱ类分子与抗原片段交联，并将抗原信息递呈给淋巴细胞。

巨噬细胞向T细胞传递抗原信息时，多数是通过细胞表面直接相互接触来完成的。只有同时在膜上表达抗原片段和MHC-Ⅱ类分子阳性的巨噬细胞才具有抗原递呈作用。

2. 抗原递呈细胞对抗原的摄取和处理

抗原的摄取主要发生在周围的淋巴器官中。当抗原进入机体后几分钟内就被输送到脾脏和淋巴结，并被其内的巨噬细胞和树突状细胞所捕获和摄取，而后进行加工和处理。

以巨噬细胞加工处理蛋白质抗原为例，其加工和处理的过程为：

(1)抗原经吞噬后被内化(Internalized)形成吞噬体(Phagosome)，与溶酶体融合后形成吞噬溶酶体(Phagolysome)，抗原在酸性囊泡内被多种水解酶所降解。

(2)抗原降解后其原先表面的一些抗原决定簇往往消失，随之出现的是一些在结构上展开了的蛋白质片断和多肽链，因而出现了一些新的抗原决定簇，使原先包裹在内部的抗原决定簇暴露出来。

(3)在胞浆内连续的膜系统中，粗面内质网合成的 MHC-Ⅱ类分子可选择性地与吞噬细胞溶酶体降解产生的某些抗原片段结合，形成 MHC-Ⅱ类分子与抗原片段的复合体，经过高尔基体转运到细胞膜表面，这种存在于抗原递呈细胞膜上的复合体能有效地将抗原信息递呈给抗原特异性淋巴细胞，完成抗原加工处理过程。

3. 抗原递呈细胞对抗原的递呈

表面有抗原片段的抗原递呈细胞通过与抗原特异性 T_H 细胞的直接接触和相互作用，将抗原递呈给 T_H 细胞。T_H 细胞在识别外来抗原片段的同时还要识别自身的 MHC-Ⅱ类分子，此种识别称为双重识别。因而，只有 MHC-Ⅱ类分子阳性的巨噬细胞才能向 T 细胞和 B 细胞递呈抗原。巨噬细胞在感应阶段的作用是摄取、处理、递呈抗原和调节免疫应答。

二、反应阶段

反应阶段(Response stage)是抗原特异性淋巴细胞的活化、增殖与分化阶段，又称为增殖和分化阶段(Proli-ferative and differentiation stage)。

T 淋巴细胞通过双重识别之后，激活转化为淋巴细胞，随之母细胞增殖、分化，最终成为具有各种免疫效应的致敏淋巴细胞。在母细胞化过程中，胞体增大，胞浆增多，染色质疏松，出现明显的核仁、微管和多聚核糖体形成，大分子物质合成与分泌增加。T 细胞在活化、增殖与分化过程中，除产生效应性细胞外，并分泌一系列细胞因子，使免疫应答向纵深发展。

B 淋巴细胞受抗原刺激后，与 T_H 细胞相互作用而活化，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

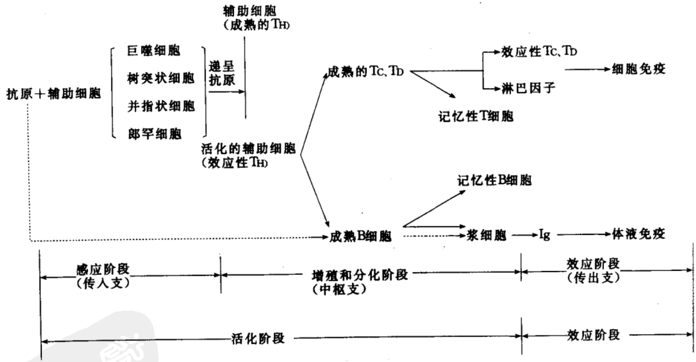
随之也发生增殖和分化，其中有些转化为浆母细胞，再分化成熟为抗体形成细胞(Antibody forming cell，AFC)，合成和分泌抗体。抗体形成细胞包括形态各异的浆母细胞和浆细胞。

致敏淋巴细胞与浆细胞是终止细胞，不再分化，寿命短。受抗原刺激后的淋巴细胞，在增殖、分化过程中，一部分细胞在中途停顿下来，不再继续分化，成为记忆细胞而长期存在。

三、效应阶段

效应阶段(Effective stage)是效应细胞和效应分子发挥效应的阶段，或是免疫效应物质与相应的抗原或带抗原的靶细胞结合而发挥免疫效应的阶段。此阶段主要包括免疫应答过程最终产生的致敏淋巴细胞和效应物质，如淋巴因子和抗体等，作用于抗原，产生细胞免疫和体液免疫。

在此阶段中，浆细胞合成并分泌免疫球蛋白，进入体液或组织，与抗原特异性结合，中和毒素，在巨噬细胞或在补体的协同作用下，杀死病原体或破坏抗原，发挥体液免疫效应。而经血流运至抗原所在地的致敏淋巴细胞，当再次接触抗原时，即通过释放淋巴因子直接杀伤靶细胞，破坏和清除抗原，发挥细胞免疫效应(图 7-1)。



（TI抗原以虚线表示）

图7－1　免疫应答过程示意图

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第三节　牙髓的免疫应答

牙髓的免疫应答首先表现在对外来抗原刺激的炎症反应上。虽然化学、热、机械、电、放射或微生物等刺激均可引起牙髓的炎症反应，但是最常见的、主要的还是龋齿和牙菌斑中微生物及其毒素的抗原刺激。

龋洞中的微生物及其代谢产物、毒素等抗原物质所引起的牙髓炎症反应，主要见于与龋洞底部相连的牙本质小管下方的牙髓区域内。这不仅是抗原经小管途径弥散的表现，而且说明在龋病有关的牙髓变化实际发生在细菌入侵之前、龋病一开始，当牙本质外层患龋时，牙髓就可能出现反应，当深龋接近修复性牙本质时，牙髓中即可出现慢性炎症。而当细菌侵入牙髓时则可能形成脓肿。

由龋齿引起的牙髓炎症，常在接近暴露的髓角处，或相应于龋洞底的部位。1995 年，曹志中在牙髓炎性痛过敏机制的实验研究中，将从临床采取的新鲜龋坏组织封入大鼠磨牙咬合面制备的窝洞内，结果 24h 后出现了急性牙髓炎症或慢性牙髓炎症。

牙菌斑的大多数 G^+ 和 G^- 细菌，都能激活大部分免疫途径，随着细菌积聚的增加，牙菌斑在免疫应答中的作用更为复杂。为了证实牙菌斑成分对牙髓的作用，Bergenholtz 曾在新制备的牙本质洞内应用牙菌斑提取物和牙菌斑细菌培养物，10～32h 后，在邻近洞底的牙髓组织中有明显的血管炎症和白细胞聚积。Majave 在用牙菌斑进行猴牙实验中，发现牙菌斑中某些溶解物能引起牙髓炎症变化。这些研究说明牙本质

对防止牙髓组织免于有害因素损伤的能力是很差的。

牙髓炎症常常是龋病发展的结果，免疫学认为牙髓的炎症变化是牙髓对抗细菌和某些抗原刺激的免疫应答。

随着龋病的发展，细菌和某些可溶性抗原的刺激，牙髓中可出现典型的炎症变化，除血管扩张通透性增加、多形核白细胞渗出外，在成牙本质细胞层下方还有淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞浸润。炎症牙髓中的这些细胞皆为免疫细胞，在抗原的持续作用下，它们或增殖、分化为分泌各种免疫球蛋白的抗体形成细胞，或增殖、分化为具有各种免疫效应的致敏淋巴细胞，从而使牙髓出现一系列有关的免疫反应。

一、体液免疫应答

体液免疫应答是以浆细胞产生抗体并发挥效应功能的免疫应答，因此，又被称为抗体介导的免疫应答（Antibody-mediated immunity，AbMI）。

任何部位的免疫现象都是由该部位出现的免疫细胞而体现的。许多研究表明，炎症牙髓中有许多抗体形成细胞，产生的抗体有IgG、IgA、IgM和IgE等，这些抗体形成细胞随着炎症的出现而出现，随着炎症的消失而消失，炎症越明显，细胞数越多。无疑，抗体形成细胞或免疫球蛋白在牙髓的炎症反应中起着重要的作用。

抗体是特异性体液免疫的效应分子。抗体的效应活性具有广泛的生物学作用，包括激活补体作用，溶解细胞，凝集颗粒，沉淀可溶性抗原，中和毒素，调理作用，促进吞噬、封闭作用及促进靶细胞与K细胞、巨噬细胞的结合，导致靶细胞的杀伤等，从而使人牙髓具有防御性或超敏性免疫反应能力。可

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

局部合成抗体的炎症牙髓组织存在明显的抗体介导的体液免疫应答。

但是，牙髓组织在对抗原物质的反应中，其渗出物的引流和牙髓的正常恢复受到牙髓组织所处特殊解剖结构的妨碍。

二、细胞介导免疫

细胞介导免疫(Cell-mediated immunity, CMI)或细胞免疫(Cellular immunity, CI)，既包括原始的吞噬作用和K细胞、NK细胞介导的细胞毒作用，也包括T细胞介导的特异性免疫，或致敏淋巴细胞与特异性抗原的反应。

Perovic等曾进行研究证实牙髓的细胞介导免疫反应。他在实验中以完全佛氏佐剂与同种异体牙髓使兔子致敏，然后用异体巨噬细胞混悬液封于下颌切牙牙髓的切端，次日拔除该牙进行组织学检查，结果发现异体巨噬细胞移动受到极大抑制，甚至完全停止。这是致敏T淋巴细胞在特异抗原的作用时释放了巨噬细胞移动抑制因子的结果。

T细胞介导的免疫应答有两种基本形式，一是通过释放淋巴因子引起的单核细胞浸润为主要的炎症反应；另一个是特异性细胞毒作用。因此，不能忽视细胞介导免疫在牙髓病变中的作用。

近年，随着免疫学的发展，发现淋巴细胞在特异性免疫的形成与发展中具有重要作用，是构成细胞免疫和体液免疫的细胞。细胞免疫的概念已超过吞噬细胞吞噬作用的范围。目前认为，细胞介导免疫主要是指在免疫过程中由致敏T细胞及其产生的介质参加的一类免疫应答。吞噬细胞中功能最强的是经T细胞淋巴因子激活后的吞噬细胞。因此认为细胞免

疫应扩大到非抗体介导的吞噬细胞，凡是体液免疫以外，由淋巴细胞和吞噬细胞所导致的细胞免疫应答，均称为细胞免疫。

由于细胞免疫与体液免疫有交叉关系，实际上不可能把细胞免疫与体液免疫完全分割开来，例如，在启动体液免疫的过程中，必然有细胞的作用，而且抗体在许多方面影响着细胞免疫反应，不可能在完全没有抗体的情况下产生细胞免疫。而且，参与细胞免疫的细胞所产生的介质又可交替地影响着 T 细胞和 B 细胞，因而，最近又将细胞免疫的概念扩大到以抗体为次要作用的任何细胞的免疫应答。

尽管如此，目前对牙髓中的任何一种免疫应答都还缺乏充足的证据，它们在牙髓尖周病发病中的作用还有待于进一步证实。

三、牙髓的变态反应

抗体的产生虽可保护牙髓，但相继出现抗原-抗体复合物，并引起一系列与多形核白细胞浸润和溶酶体释放有关的反应。由此，组织损伤、血管变化、水肿、牙髓体液容积增加，而使疼痛程度随牙髓炎的严重性而加剧，甚至导致血管破坏，组织坏死。因此，免疫病理可能是牙髓炎症时组织破坏的原因。

免疫反应可作为牙髓的防御机制，也可作为组织损害的介导。变态反应是异常的免疫反应。由于牙髓内含有相应的抗原、抗体和一些生物活性成分，牙髓是可能出现抗体介导或细胞介导的变态反应。

1. Ⅰ型变态反应

Ⅰ型变态反应是由 IgE 的 FC 段结合在肥大细胞或嗜碱粒细胞的细胞膜上，再次与抗原结合后促使肥大细胞等胞内

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

颗粒释放介质，引起平滑肌收缩及毛细血管扩张等而发病。I型变态反应的全部组分均可在炎症牙髓中出现，如肥大细胞，产生 IgE 的浆细胞及组织胺等。而且文玲英等证实，肥大细胞既存在炎症牙髓中也存在于正常牙髓中，炎症牙髓的肥大细胞数目明显增多。

肥大细胞的主要功能是由它们贮藏的颗粒而实现，在I型变态反应中，肥大细胞起着关键作用。然而，近年来人们已注意到肥大细胞在慢性炎症中的作用，并定义为迟发反应(Later phase reaction，LPR)。尽管对 LPR 发生的详细机制还不十分清楚，但有实验表明 LPR 的发生与肥大细胞颗粒中的介质有着密切关系。近年还发现，肥大细胞具有产生多种细胞因子的特性，并通过其分泌的细胞因子如 TNF-α，IL-1 等导致血管通透性增加和淋巴细胞浸润，从而参与 LPR 炎症过程。TNF-α 代表着肥大细胞的一种新的介质类型，与目前已知的肥大细胞介质，如组胺类或脂源性介质不同，TNF-α 的分泌既有来自胞内预先合成的，亦有刺激后新合成的。因而，肥大细胞很可能在牙髓的慢性炎症中发挥着重要作用，牙髓的I型变态反应的表现可能是组织的慢性炎症。

2. Ⅱ型变态反应

Ⅱ型变态反应又称为细胞毒型(Cytotoxin type)或细胞溶解型(Cytolytic type)变态反应，是指细胞表面抗原或细胞上吸附的半抗原与抗体，主要是 IgG 和 IgM 相结合或抗原-抗体复合物吸附于细胞表面后，通过激活补体引起细胞溶解，被巨噬细胞吞噬裂解；或不需要补体，被非粘连性的 K 细胞杀伤溶解等途径损害靶细胞。被溶解、毒害的细胞主要是血细胞或某些组织的细胞。

炎症牙髓中也含有与细胞毒免疫反应有关的主要成分：牙髓细胞携带着抗原；炎症牙髓内有产生 IgG、IgM 抗体的浆细胞。当它们产生的抗体与表面具有抗原性的细胞接触时，则可能发生细胞溶解现象。用标记的抗血清，有时在炎症牙髓中可以看到补体，说明相应的抗原、抗体结合后激活了补体，从而可招引其他细胞来吞噬、销毁或溶解。牙髓炎症时也许存在着Ⅱ型变态反应。

3. Ⅲ型变态反应

Ⅲ型变态反应是由可溶性小分子的抗原-抗体复合物引起的，又称为免疫复合物型(Immune complex type)或血管炎型的变态反应。其主要特点是细胞外游离的抗原与相应的抗体结合成免疫复合物(Immune-complex，IC)，在一定条件下，若不能及时清除，此免疫复合物则可沉积于组织，并通过激活补体或其他细胞成分，最后造成以中性粒细胞浸润为主的炎症性病变，此种病变伴有出血、水肿和组织坏死。

Arthus 反应是给已免疫的动物皮内注入同种抗原后，数小时内局部出现水肿、红斑、硬结、坏死等为特征的炎症反应。此反应是Ⅲ型变态反应的典型症状，是由 Arthus(1903 年)首先发现的，称为 Arthus 反应。Arthus 反应需要三个组成部分：免疫复合物、补体系统和多形核白细胞。其反应过程是通过抗原-抗体免疫复合物激活补体，引起一系列与多形核白细胞浸润和溶酶体释放有关的反应，由此出现血管变化、炎细胞浸润、组织损伤的炎症变化。

某些牙髓炎症是抗原刺激的结果，机体产生的循环抗体又可能导致牙髓的免疫病理变化，牙髓组织可发生以 Arthus 反应为特征的Ⅲ型变态反应。其实验研究有：

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

Bergenhaltz 和 Adamikiewicz 用牛血清白蛋白免疫猴，再于暴露的猴牙牙本质上局部应用该蛋白，观察牙髓中是否有诱导的炎症反应。结果，免疫猴的所有牙髓对牛血清白蛋白的应用都出现了明显的炎症反应，34 个牙有 26 个牙髓中出现了严重或极严重的反应，8 个牙出现了中度反应。牙髓炎症的特征是：靠近窝洞底部牙本质小管的牙髓区域内，血管扩张、充血、组织水肿，血管外组织中有大量多形核白细胞浸润聚集，有的部位形成脓肿，有的出现坏死。与此同时，免疫猴的血清中有高效价的牛血清白蛋白抗体，且主要是 IgG 抗体。因此，这些抗体在介导所观察到的牙髓病变中起了决定性作用，牙髓组织出现的炎症与 Arthus 反应极为相似。

而后，Adamikiewicz 等又用卵白蛋白致敏兔子，直到获得高效价循环抗体和出现 Arthus 皮肤反应后，再用同样的卵白蛋白 0.001ml 在切牙牙髓作局部攻击，于不同时间去除牙髓进行观察，结果，光学显微镜观察到牙髓病变；电子显微镜观察到血管出现渐进性损害，内皮细胞连接破裂，空泡形成；免疫荧光观察到牙髓中有卵白蛋白-抗卵白蛋白免疫复合物的沉淀等，说明牙髓组织出现了 Arthus 反应。

文玲英等用 O 溶血素致敏家兔，获得高效价循环抗体和 Arthus 皮肤反应后，再用同一抗原于牙髓作局部攻击。结果，牙髓出现了急性炎症，组织中有免疫复合物，其特异荧光主要位于血管壁。因而，进一步明确了抗原-抗体复合物在牙髓损害中的作用。该实验采用 O 溶血素致敏和攻击，是因为 O 溶血素是溶血性链球菌的一种溶血毒素，属于蛋白质，具有致敏活性，抗原性很强。虽然人体感染链球菌的部位多在扁桃体、上呼吸道、皮肤等，但牙髓和尖周组织也可被感染而激起免疫

反应。牙髓感染溶血链球菌后，不但可能激起其他脏器的变态反应性损害，而且若经牙髓再次接触到同样的细菌毒素后，牙髓局部也可出现病变。

有广泛龋病和获得性免疫的患者，其牙髓内可能出现炎症变化，这种变化是由于从前连续暴露于抗原后而产生大量特异性抗体的结果。

第四节　尖周组织的免疫应答

尖周病(Periapical diseases)绝大多数由牙髓病而来，而且主要通过牙髓治疗达到治愈，因此称为龋病、牙髓病的继发病。近年，随着口腔疾病免疫学的进展，越来越多证据说明，在尖周组织疾病中，免疫应答起着重要的作用。

免疫应答可以防止疾病，也可以产生疾病，造成组织损害。目前认为，慢性尖周炎是机体对根管系统抗原的病理免疫反应性疾病。尖周组织的破坏是病理性免疫反应的结果。

一、引起尖周组织免疫病理的抗原物质和免疫成分

1. 根管内的抗原物质

免疫反应必需的成分是抗原，通过根管系统引起尖周组织免疫反应的抗原物质有：①聚集于根管内活的或死亡的口腔细菌和细菌毒素；②感染变性坏死的牙髓组织及其分解产物；③牙髓治疗药物中的半抗原与体内蛋白结合形成的抗原物质。这些抗原物质不断通过根尖孔进入尖周组织，引起局部或机体的免疫反应。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

2. 尖周病变中的免疫成分

免疫反应亦需要有免疫成分参与。尖周病变中的免疫成分有：①尖周病变中存在淋巴细胞、浆细胞、多形核白细胞、巨噬细胞、肥大细胞和嗜酸性细胞。这些细胞都是在免疫反应中发挥作用的免疫细胞。②尖周病变中有产生各免疫球蛋白的浆细胞和补体成分，例如，产生 IgG、IgA、IgM、IgE 的浆细胞，其中 IgG 的浆细胞数最多，其次是 IgA、IgM、IgE 细胞，且在血管壁及其附近的结缔组织中有 C_3 补体成分。③尖周病变中的 T 淋巴细胞及其亚群等。

在尖周病变的免疫成分中，在炎症的不同时期内，淋巴细胞都是其中的主要细胞，约占炎细胞总数的 50%～60%，其中 T 细胞数多于 B 细胞数。而在 T 细胞的两个亚群中，T_H 和 T_S 在免疫反应中起着重要的调节作用，又称为调节性 T 细胞。

3. 尖周病变中 T_H 和 T_S 的变化

有关尖周病免疫病理的资料大多来自对人牙慢性尖周炎症的分析，以及对大鼠实验性尖周炎的研究。

在大鼠尖周病模型中，病变早期骨破坏显著时，T 细胞亚群中的 T_H 数高于 T_S，T_H/T_S 为 1.70。病变进展减慢时，T_H 与 T_S 的数目接近，T_H/T_S 为 0.9。

由于 T_H 可以活化巨噬细胞，刺激骨吸收因子 IL-1、TNF-α 的分泌，促进 B 细胞形成抗体，因此，T_H 的介导功能在病变发展中发挥关键作用。T_S 在病变的慢性期占优势，使之在局部形成一种免疫抑制环境，抑制过强的免疫反应，避免组织损害过大。T_H/T_S 是宿主免疫调节状态的一个指标，T_H/T_S 随病变发展而变化，它们的比值反映了 T 细胞的调节平衡

作用，说明尖周病变的免疫应答是高度受控的。研究还发现，在尖周病变中，T_H 丰富的区域，IgG 浆细胞数明显增高，T_H 和产生 IgG 的浆细胞是共同对抗原发生反应的。

二、尖周组织的病理性免疫应答

许多研究证实，尖周病变中含有各类免疫成分。

由于抗原和免疫成分的相互作用，可引起尖周组织的病理性免疫应答，或包括各型变态反应在内的免疫病理反应。尖周病可能是其中的一型或几型的联合。

1. 速发型变态反应

速发型变态反应的主要免疫成分是 IgE 和肥大细胞。Mashiesen、Pulver、Levy 等均证实尖周病变中有产生 IgE 的浆细胞和肥大细胞。Torabinejad 曾用过氧化物酶和抗过氧化物酶检查 27 个尖周病变组织，其中有 20 个有 IgE 浆细胞，占 74%。因此，在尖周病的发病中可能有 IgE 介导的变态反应。当抗原作用于结合在肥大细胞或嗜碱粒细胞表面的 IgE 抗体后，则可引起细胞脱颗粒，再释放组织胺和其他介质，结果发生急性炎症反应，同时发生骨质破坏。

2. 细胞毒型变态反应

细胞毒型变态反应或溶细胞性变态反应的主要免疫成分是 IgG、IgM 和补体。Naidro 在根尖肉芽肿内观察到了许多 IgG 细胞，他认为来自根管系统抗原的主要抗体是 IgG。而且，Molmstrom 在尖周病变中也发现许多产生 IgG、IgM、IgA 等浆细胞和 C_3 补体。Jones 应用放射性氨基酸（^{14}C 异白氨酸和 ^{14}C 赖氨酸）孵育尖周病变组织，证实有 IgG 和 IgA 的合成。当两个相邻的 IgG 分子或一个 IgM 分子与作用于细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

表面的相应抗原连接时，在补体的参与下，被激活的补体系统则导致细胞膜的破坏或溶解，从而发生细胞毒型变态反应。

3. 免疫复合物型变态反应

免疫复合物型变态反应又称血管炎型变态反应，其典型的局部病变是 Arthus 反应，一般认为这样的组织损害与尖周病的发病有重要关系，主要的免疫成分是各种免疫球蛋白和补体。抗原-抗体免疫复合物是本型变态反应的标志。Torabinejad 已证实人牙尖周病中有免疫复合物。

当抗原-抗体免疫复合物局部沉积后，则激活补体系统，产生 C_{3a}、C_{5a}、C_{5b}等因子，这些因子对尖周组织中的多形核白细胞有亲和力，或有趋化作用。当免疫复合物均附着于多形核白细胞，或被多形核白细胞吞噬时，释放溶酶体。溶酶体含有前列腺素、组织蛋白酶、激肽酶和降解酶等许多损伤组织的酶；而且多形核白细胞也含巨噬细胞趋化因子，吸引巨噬细胞至病变部位。巨噬细胞除吞噬局部的抗原外，也释放前列腺素、胶原酶、酸性水解酶和在病变发病和修复中起重要作用的细胞因子。因此，除由多形核白细胞释放的物质外，巨噬细胞释放的细胞因子也能引起尖周组织的破坏。

4. 迟发型变态反应

迟发型变态反应为细胞介导的免疫反应，成为致敏淋巴细胞和特异性抗原的反应。Dietg 曾将根管内容物的滤液作为抗原进行皮内试验，结果有 40%的尖周病患者出现阳性皮肤反应。Stabholz 用坏死牙髓作抗原进行末梢血白细胞游走抑制试验，结果发现尖周病患者的外周血白细胞游走抑制率较对照组有明显增高。说明尖周病患者的外周血白细胞中有抗坏死牙髓抗原的细胞介导免疫反应。但这仅是迟发型超敏

反应能够发生在尖周组织病变中的间接证据，并不能代表病变组织的T细胞情况。而Morse，Forber等用扫描电镜观察了尖周损害的细胞组成，发现大多数淋巴细胞是T细胞，同时病变区还有大量的巨噬细胞，认为是迟发型超敏反应在尖周病中起作用的一个迹象。Stern对11例尖周肉芽肿的检测也获得了细胞介导免疫在尖周病中起作用的证据。Farber和Tornek一样，认为尖周组织最常见的反应类型可能是对根管系统抗原物质的迟发型超敏反应，有时也出现Arthus反应。

尽管尖周组织中的免疫反应是作为机体对根管系统中的抗原所产生的一种保护性反应，但邻近组织的损伤是不可避免的。由于根管系统中不断释放抗原的结果，组织的变更更加明显，尖周组织损害亦随之增大。为此，特别强调：只有将根管中的抗原物质彻底清除干净，尖周组织的免疫反应才可能终止。因而，进行根管机械预备，彻底地从根管内清除抗原物质，仍然是根管治疗中最重要的处理方法。

三、尖周组织的炎性细胞和病变类型

酯酶染色又称ANAE染色，可对T淋巴细胞起特异性标记。单核细胞或巨噬细胞、浆细胞、嗜酸粒细胞等也对酯酶起阳性反应。

作者曾采用酯酶着色的组织化学方法对根尖肉芽组织肿块的炎性细胞相对分布进行研究，结果，在26例随拔牙牙齿带出并紧紧附丽于根尖的肉芽肿中，浆细胞占优势的14例，T淋巴细胞占优势的12例。前者有大量炎细胞浸润和丰富的毛细血管，浸润的细胞中除大量浆细胞外，并有较多的多形核白细胞及散在的淋巴细胞、巨噬细胞，表现向急性炎症转化的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

趋势；后者除较多的T细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和胶原纤维外，并有浆细胞，多形核白细胞散在于组织内，表现向慢性炎症转化的趋势。即：在急性炎症转化的病例中浆细胞和多形核白细胞较多；向慢性炎症转化的病例中T淋巴细胞和巨噬细胞较多。由于浆细胞的存在表示抗体的存在，T细胞的存在表示淋巴因子的存在，因而病变中以浆细胞占优势的炎症反应可能是体液免疫反应为主体的炎症反应；以T细胞占优势的炎症反应则可能是以细胞免疫反应为主体的炎症反应，是迟发性超敏反应的表现。

该研究与 Jahannessen 等的研究结果一致。在尖周组织的炎性细胞与病变类型的关系中，浆细胞、多形核白细胞与有急性炎症趋势的尖周病变密切相关，说明尖周组织炎症病变的动态变化，包含着细胞群的变化或免疫反应类型的变化。

在尖周病组织中，巨噬细胞的出现总是伴随着T细胞而出现，此种分布特征则可能是T细胞趋化作用的结果，同时也表明巨噬细胞在趋化慢性炎症过程中或炎症修复中的作用。

四、根管渗出液的抗体成分和细胞因子

1. 根管渗出液的抗体成分

根管内的渗出液是尖周组织炎症时通过根管的渗液，富有蛋白质。检测根管渗出液中的免疫球蛋白亦是探讨尖周病免疫病理的途径之一。

文玲英等于 1993 检测了 50 例单根前牙和前磨牙因创伤或因畸形中央尖感染患牙根管渗出液中的免疫球蛋白，术前X线片显示所有患牙均有尖周稀疏区。其中 24 例尖周骨质破

坏边界整齐，根管渗液呈透明清亮或透明褐色；26 例尖周骨质破坏边界弥散，渗出液为血性或脓血性。依据 X 线片和渗出液的色泽性状分为两组，前者为尖周囊肿，后者为尖周脓肿。

结果表明：①所有病例根管渗出液中的 IgG 含量都较高；②清亮渗液中的 IgA 含量高于血性渗液；③血性渗液中的 IgM 含量又高于清亮渗液，而且，血性渗液的患牙在临床上多数有十分明显的疼痛、肿胀、松动、叩痛症状，清亮渗液的患牙，多数无明显症状。根管渗液中的 IgG、IgA、IgM，应是尖周病变组织中浆细胞的产物，也是尖周病病理过程中体液免疫反应的证据。两类渗液中 IgG 含量均最多，表明它是尖周病免疫反应的重要物质。清亮渗液中 IgA 含量较高，表明 IgA 的分泌与尖周囊肿的形成有关。

血性和脓血性渗出液中 IgM 含量较高，表明 IgM 的分泌与尖周脓肿的形成或慢性炎症急性发作有关。IgM 是机体或组织受到抗原刺激后，体内首先出现的抗体，因此，在感染的早期，IgM 起先锋免疫作用。然而，由于两个相邻的 IgG 分子或一个 IgM 分子作用于细胞表面的抗原时，在补体的参与下，可使细胞溶解、组织损伤，因此，在急性炎症的发病中，或慢性炎症急性发作中，IgM 亦起了重要作用。

Matsuo（1995）采用酶联免疫吸附（ELISA）检测 69 例单根牙尖周渗出液中的 IgG 和 IgA 含量，并依据尖周 X 线阴影长度分为两组：大于 1cm 者为大病变组，小于 1cm 者为小病变组，其中又以是否有触痛再分为触痛组和无触痛组。结果表明：①根尖渗出液的 IgG 含量显著高于 IgA；②渗液中的 IgG 量明显高于健康人血清的 IgG 含量。IgA 含量则接近人

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

血清的 IgA 量；③渗液中的 IgG 含量与尖周病变大小和粘膜有无触痛均有关。

许多研究证实，人牙尖周病变中存在免疫活性细胞，如巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、合成免疫球蛋白的浆细胞等。但在尖周病变的免疫活性细胞中，合成免疫球蛋白的细胞是为主导细胞，其中，合成 IgG 和 IgA 的细胞又占主要地位，它们确可在病变组织中产生 IgG 和 IgA，说明尖周病变局部的免疫反应是活跃的。

2. 根管渗出液的细胞因子

1）白细胞介素 1(IL-1)　IL-1 具有广泛的免疫调节、致热和介导炎症的作用。它能增强 T 细胞的辅助功能，促进各种效应 T 细胞诱导 B 细胞的分化和抗体产生，刺激成纤维细胞诱导其产生胶原酶和前列腺素，促进破骨细胞的活性，从而加速骨吸收。因此在尖周病发病过程中的作用逐渐受到人们重视。

岩本等人最早在感染根管的渗出液中检测到 IL-1 的存在，并且发现与临床症状有显著的相关性。谷信等人用感染根管中细菌的粉碎菌体上清液检测其诱导 IL-1 的性能，结果表明，G^-厌氧菌 IL-1 诱导活性最高，而细菌外毒素几乎没有诱导性能。由此证明感染根管中的细菌的 IL-1 诱导性能主要是从菌体成分而来。细菌刺激尖周组织中的巨噬细胞产生 IL-1，从而使浸润的 T、B 细胞活化，激活尖周组织的免疫反应，诱导尖周病变产生。

用 ELISA 方法检测感染根管渗出液中的 IL-1α 和 IL-1β，结果，IL-1α的浓度是，尖周阴影在1.0cm以下者较1.0cm 以上者高，有脓液者较无脓液者高；IL-1β 的浓度与临

床表现无明显关系，而且高于IL-1α的浓度；在尖周囊肿的根管治疗过程中，IL-1β的浓度随渗出液的减少而减少，IL-1α则有随渗出液的减少而增高的趋势。

用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)进行检测，结果，IL-1β的基因表达急性期病例较慢性期为强；急性期病例中的IL-1β表达又较IL-1α为强。说明做为破骨细胞活化因子之一的IL-1β，具有促进牙槽骨吸收和损伤组织的作用。因而，尖周炎症有无活动，根据这种因子活性的强弱便能了解。

2)白细胞介素6(IL-6) IL-6作为一种重要的炎症介质，与炎症性疾病有密切关系。目前已越来越被人们所重视，许多学者对其在牙龈炎、牙周炎组织中的表达及在这些炎症中的作用已作了充分肯定。近年，有人采用ELISA免疫组织化学方法，检测牙髓、尖周炎症组织渗出液中IL-6含量和炎症牙髓组织中IL-6的表达。结果，炎症牙髓和炎症尖周组织的渗液中都有IL-6，急性炎症期的含量较高，急性尖周炎高于急性牙髓炎；炎症牙髓组织中的IL-6表达阳性，主要阳性表达细胞为单核-巨噬细胞、成纤维细胞和少量血管内皮细胞。因而说明IL-6与牙髓、尖周组织的局部炎症密切相关，在牙髓、尖周组织炎症中IL-6主要参与急性期炎症反应。它的分泌和表达与炎症状态下炎细胞的渗出，炎性介质的存在有关。

3)肿瘤坏死因子(TNF) TNF也是炎症中的一种重要细胞因子，除具有杀伤或抑制肿瘤细胞的功能外，还能增强机体的局部炎症反应，刺激单核-巨噬细胞分泌IL-1，并调节MHC-Ⅰ类抗原的表达。PCR检测表明感染根管渗出液中有较强的TNF基因表达，表明TNF是尖周病变中细胞因子网

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

络的重要成员之一。

IL-1、IL-6 和 TNF 有许多相同的生物学作用，它们之间的相互作用直接与炎症病变的形成有关。

五、尖周病变中的破骨细胞

尖周病变中的破骨细胞是骨吸收的主要作用者。目前认为，破骨细胞的形成和活化受多种因素影响，其骨吸收作用依赖于成骨细胞的存在。Mcsheehy 研究表明，成骨细胞介导的破骨作用不是通过改变骨基质来实现的，而是释放一些可溶性物质，刺激破骨细胞性骨吸收。Boyed 指出，硬组织形成细胞对破骨细胞的作用主要是阻止或允许破骨细胞与硬组织接触。因此，任何影响硬组织形成细胞功能的因子，都将影响到破骨作用。Horton 曾提出破骨细胞活化因子(OAF)的作用，实际上是 OAF 的主要成员的 IL-1，IL-6 和 TNF 等的作用，这些细胞因子都具有刺激骨吸收的能力。Thomson、Brain 等认为，TNF 和 IL-1 并不直接作用于破骨细胞，而是作用于成骨细胞，再由成骨细胞介导破骨细胞性骨吸收。破骨细胞的形成需要活的骨形成细胞存在。

因 OAF 的主要成员都是巨噬细胞源性的细胞因子，广泛分布于尖周病变组织中的巨噬细胞与尖周骨质破坏关系密切。

总之，尖周组织的免疫病理反应，有包括巨噬细胞在内的各类免疫细胞、免疫球蛋白、T 细胞亚群，以及与组织损害和修复有关的多种细胞因子参与。

主要参考文献

1. 吴敏毓，刘恭植编著. 医学免疫学. 合肥：中国科学技术出版社出版，1993. 77～89

2. 李君瓔，黄惟让. 免疫生物学概论. 北京：高等教育出版社，1992. 134～160

3. 郑麟蕃，吴奇光编著. 口腔病理学. 上海：上海科学技术出版社，1993. 181～183

4. 曹志中. 牙髓炎性痛过敏机制的实验研究. 西安：第四军医大学博士学位文，1995

5. 张亮林综述. 肥大细胞的分子生物学及其生物学效应新进展. 国外医学：免疫学分，1995，4：200～203

6. 文玲英综述. 牙髓尖周病免疫学. 国外医学：口腔医学分册，1984，6：324～328

7. 文玲英，李伟英，李益民. 炎症牙髓的抗体产生细胞. 华西口腔医学杂志，1984，2(4)：214～216

8. 文玲英，马福成. 人牙髓中的肥大细胞. 实用口腔医学杂志，1989，5(2)：180～110

9. 文玲英，潘苏，孙庆妹. 实验性牙髓 Arthus 炎症反应. 华西口腔医学杂志，1986，4(4)：253～255

10. 文玲英，马福成. 尖周肉芽肿的酯酶阳性炎症细胞. 实用口腔医学杂志，1990，6(增刊)：620～721

11. 文玲英，魏建勤. 尖周病患牙根管内渗液的免疫球蛋白. 牙体牙髓牙周病学杂志，1993，3(1)：19-20

12. Stashenko P, Yu. SM. T helper and T suppresser cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. J Dent Res, 1989, 68: 830～834

13. Takashi M, Shigeyuki E, Yoshio S, et al. Quantitative analysis of immunocompentent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. Jounal of Endodontics, 1992, 18: 497～500

14. 赵守亮综述. 破骨细胞形成和骨吸收机理. 牙体牙髓牙周病学杂志，1996，6

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

(1):53～55
15. Thomson BM, Saklatvala J, Chambels TJ. Osteoclasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resoption by rat osteoclast. J Exp Med, 1986,164:104
16. Brian M, THomson G, Gregory R. Tumor necrosis factors A and B induce osteoblast cells to stimulates osteoclasts bone resorption. J Immun, 1987, 138:175
17. Boyed A, Ali NN, Jones ST. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. Br Dent J, 1984,156:216
18. Philip stashenk. THe role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. Endod Dent. Iraumatol, 1990,6:89～96
19. Akamine A, Anan H, Hamachi T, et al. A histochemical study of the behavior of M Φ during experiment apical peridontitis in rat. Joural of Endod, 1994,20:474～480
20. Akamine A, Hashiguch I, Toriya T, et al. Immuno- histochemical examination on the localization of MΦ and plasma cells in induced rat periapical lesions. Endod Dent Traumatol, 1994,10:121～128
21. Takashi Okiji, Nobayuki Kawashima, Toshihiko Kosaka, et al. Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in varions stages of induced periapical lesions in rat molars. Journal of Endod,1994,20:27～31
22. Nobuyuki Tani-Ishii, Kazuhiyo kuchiba, Tamotsu osada et al. Effect of T-cell deficiency of the formation of periapical lesions in mine histological comparison between periapical lesions-formation in BALB/C and BALB/c nu/nu mine. J Endod, 1995,21(4):195～199
23. Matsuo T, Nakanishi T, Ebisn S. Immunoglobulins in periapical exudates of infected canals. Correlations with the clinical findings of the involved teeth. Endod Dent Traumatol, 1995,11:95～99
24. Takafumi Hamachi, Hisashi Anan. Akifumi Akamina, et al. Detection of IL-β mRNA in rat periapical lesions. J Endod, 1995,21:118～121
25. Matsuo T, Nakanishi T, Ebisu S. Immunolgobulins in periopical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. Endod Dent Traumator, 1995,11:95～99

第八章　免疫细胞化学在牙髓免疫学研究中的应用

免疫细胞化学(Immunocytochemistry)又称免疫组织化学(Immunohistochemistry)，是将各种标记物连结到抗体或抗原分子上，以检测和定位组织内相应抗原或抗体的技术。

免疫细胞化学的基本原理是抗原抗体反应、标记化学反应和显色化学反应。它使免疫学的特异性和敏感性与形态学的精密性紧密地结合起来，可以最大限度保存细胞和组织内待检测物质的抗原性，或采用各种增敏技术，使用高度敏感和高度亲和力的抗体，检出细胞内超微量的抗原成分，用显微镜或电子显微镜观察结果。因此，免疫细胞化学是在细胞、分子水平或基因水平的检测技术。

近年，由于分子生物学理论和技术的日益发展，基因探针、核酸分子杂交技术、原位 PCR 技术、核酸杂交和免疫细胞化学的双标记技术以及电镜杂交技术等成为免疫细胞化学技术的新成员，并将基因重组技术、单克隆抗体技术和免疫细胞化学技术融合在一起，把原位定性、定位和定量技术提高到了更新的水平，形成了现代免疫细胞化学的新技术。

免疫细胞化学的发展对许多领域的研究起到很大的推动作用。无例外地，免疫细胞化学在牙髓生物学的应用也为我们开辟了一个新的研究领域。70 年代以来，借助免疫细胞化学

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

技术，使我们得以确定牙髓免疫细胞、细胞外基质、神经递质等生物学成分的性质、定位和分布。随着免疫细胞化学的进展，到目前为止，还发现了与牙髓生理、病理密切相关的，并极富有生物学功能的众多细胞因子，解决了过去传统组织学研究所不能完全解决的问题，揭示了牙髓组织或牙髓细胞的特殊生物学功能。

免疫细胞化学在牙髓学的应用已由单纯的形态学研究逐步向机能研究、应用研究和临床实践相结合，例如正常人牙髓和龋病牙髓中的SP、CGRP神经肽的分布特征和动态变化，表明它们与牙髓内血流的调节和痛觉传递密切相关，而且还参与组织的炎症和修复过程。在研究方法上也不断改进，如免疫细胞化学的定量研究由简单的积分法逐渐向与放射免疫测定相结合，与图像分析相结合，测定单位内和(或)每个细胞内免疫反应物含量的变化。由于牙髓免疫细胞化学研究的日益进展，现在，牙髓组织内已证实的物质有蛋白质、肽类、酶类和神经递质等，从而为牙髓生物学增添了极为丰富的内容，开辟了牙髓免疫学的新领域。

免疫细胞化学的全过程包括：抗原提取和纯化，免疫动物或细胞融合(单克隆抗体)，抗体提取和效价测定，抗体标记，细胞和组织切片标本的制备，免疫细胞化学反应和显色，观察和记录结果等。由于免疫细胞化学需要最大限度地保存细胞和组织内待检物质的抗原性，以及牙髓外围被牙体硬组织包绕的特殊解剖结构，在免疫细胞化学的全过程中，牙髓组织标本的制备、免疫细胞化学反应和显示即成为至关重要的内容。

组织标本的制备是免疫细胞化学反应和显示能否取得成功的一个重要环节，其主要目的是确保标本能有完整的形态

结构并在原位保持抗原的反应性，包括标本的取材、固定和切片。对于牙髓组织，为了既可保存牙髓活性成分的抗原性，又可观察其与牙体组织之间的解剖位置关系，应用低温脱钙冰冻切片技术是牙髓或牙齿标本制备首选的理想方法。

第一节　牙髓免疫细胞化学技术

一、牙髓免疫细胞化学技术的标本制备

牙齿低温脱钙冰冻切片法包括离体牙齿的固定、脱钙和冰冻切片。

1. 牙齿的固定及固定剂

1)PLP 液固定剂　即过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定剂(Periodate-lysine- paraformaldehyde fixative，PLP)

(1)A 液：0.1mol/L 赖氨酸盐酸盐(或盐酸赖氨酸)0.1mol/L，磷酸氢二钠(Na_2HPO_4，pH7.4)。

配制：赖氨酸盐酸盐1.827g溶于50ml双蒸水获得0.2mol/L 赖氨酸盐酸盐溶液，然后加入 Na_2HPO_4 至0.1mol/L，pH 调至 7.4，补足 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer，PB)至 100ml，使赖氨酸浓度也为0.1mol/L。置 4℃保存，可在 2 周内使用。

(2)B 液：8%多聚甲醛。取多聚甲醛 8g 加入 100ml 双蒸水中，加热 60～70℃至溶解，过滤，pH 调至 7.4，置 4℃保存。

配制：临用前取 A 液 3 份，B 液 1 份混合，再加入结晶高碘化钠($NaIO_4$)，使其终浓度也为 0.1mol/L。由于 A、B 两液

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

混合，pH 从约 7.5 降至 6.2，故固定时不需再调 pH。

该液的固定机制是借助过碘酸氧化组织中的糖类形成醛基，通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合，从而与糖形成交联。因组织抗原大多数是由蛋白质和糖两部分构成，抗原决定簇位于蛋白部分，故 PLP 固定液可选择性地使糖类固定，既稳定了抗原，又不影响在组织中的位置关系。

Mclean 和 Nakane 等认为，最佳的 PLP 混合液是含 0.01mol/L 的过碘酸盐，0.075mol/L 的赖氨酸，2 %的多聚甲醛和 0.037mol/L 的磷酸缓冲液。

PLP 固定液对组织结构、超微结构及许多抗原的抗原性保存较好，尤其是保存抗原性方面是目前较受欢迎的固定剂。

2)4%多聚甲醛磷酸缓冲固定剂(pH7.3)

(1)配方：

多聚甲醛	40g
0.1mol/L 磷酸缓冲液	1 000ml

(2)配制方法：称取 40g 多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入 500～800ml 0.1mol/L 的磷酸缓冲液，加热至 60℃左右，持续搅拌，使粉完全溶解，通常需滴加少许 1mol/L 的 NaOH 溶液才能使溶液清亮，最后补足 0.1mol/L 的 PB 至 1 000ml，充分混匀。

该固定剂较适合于光镜免疫细胞化学研究，最好是动物经灌注固定取材后，继续浸泡固定 2～24h 。而且，该固定剂较为温和，适于组织标本较长期保存。

3)4%多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠固定液

(1)配方：

A液	多聚甲醛	40g
	蒸馏水	400ml
B液	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	16.88g
	蒸馏水	300ml
C液	NaOH	3.86g
	蒸馏水	200ml

(2)配制方法：A液在500ml三角烧瓶中配置，至多聚甲醛完全溶解后冷却待用。B、C液分别配制后将B液倒入C液中，混合后再加入A液，以1mol/L NaOH或1mol/L HCl将pH调至7.2～7.4，最后补充蒸馏水至1 000ml充分混合，4℃冰箱保存备用。

该固定剂适于光镜和电镜免疫细胞化学研究，用于免疫电镜时，最好加入少量新鲜配制的戊二醛，使其最终浓度为0.5%～1.0%。该固定剂较温和，适于组织的长期保存。标本于该固定剂中，4℃冰箱保存数月仍可获得满意的染色效果。

固定后的离体牙依次于4℃下经5%、10%、15%甘油磷酸盐缓冲生理盐水洗涤15min，移入－5 ℃脱钙液中脱钙。

4)多聚甲醛-戊二醛固定剂(PG固定剂)

配制方法：用0.1mol/L pH7.4 PB稀释10%多聚甲醛水溶液，使最终浓度为1.0%，再加戊二醛至含量为0.0125%。

5)Bouin's液及改良Bouin's液

(1)配方：

饱和苦味酸	750ml
40% 甲醛	250ml

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

冰醋酸　　50ml

(2)配制方法：先将饱和苦味酸过滤，加入甲醛，混合后存于4℃冰箱中备用，临用前再加入冰醋酸。改良Bouin's液即不加冰醋酸。

该固定液为组织学、病理学常用固定剂之一，对组织穿透力较强，固定较好，结构完整。但因pH为3～3.5，偏酸性，对抗原有一定损害，且组织收缩较明显，故不适于组织标本的长期保存，而且操作时应避免吸入或与皮肤接触。

6)Karnovsky's 固定液(pH7.3)

(1)配方：

多聚甲醛	30.0g
25%戊二醛	80.0ml
0.1 mol/L PB	至1 000.0ml

(2)配制方法：先将多聚甲醛溶于0.1mol/L PB中，再加入戊二醛，最后加PB至1 000.0ml混匀。

该固定剂适于免疫电镜标本固定，用该固定液在4℃短时间固定，比在较低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存组织的抗原和细微结构。固定时最好先灌注固定，而后浸泡固定10～30min。用缓冲液漂洗后即可用树脂包埋或经蔗糖溶液处理后用于恒冷切片。

在选择固定剂时需注意，不同的蛋白质抗原对固定剂的敏感性不尽相同，对某一种抗原适合的固定剂不一定对另一种抗原适合，而且由于所用的抗血清不同，亦会影响固定剂的选择。为此，需探索既能保存标本的精细结构，又能保存待检抗原的免疫学活性的固定剂。

2. 牙齿的脱钙及脱钙液

1)EDTA 脱钙液

(1)配方：

EDTA-2Na (乙二胺四乙酸二钠)	14.50g
氢氧化钠	1.25g
甘油	15.00ml
双蒸水	加至 1 000ml

(2)配制方法：将上述 3 种成分混匀而后加双蒸水，并使 pH 值在 7.1～7.4。

EDTA 可有效地软化牙本质，对牙本质有溶解作用，脱钙时间为，人牙约需 5～7 周，乳牙 4～5 周，猫牙 3～4 周，大鼠牙 2～3 周。

脱钙结束后转入蔗糖、甘油缓冲液和聚乙烯二醇溶液中处理。

15%蔗糖+15%甘油 PBS，－5℃，6h

20%蔗糖+10%甘油 PBS，4℃，1h

20%蔗糖+ 5%甘油 PBS，4℃，1h

20%蔗糖+PBS，4℃，1h

20%聚乙烯二醇溶液中 4℃浸透 10min。

蔗糖、聚乙烯二醇和甘油是一种冷冻保护剂，它们可以与水结合，减少标本中的水分子，防止冷冻过程中标本内冰晶生成所致的组织结构形态改变。同时，甘油可以降低脱钙液的冰点，保证脱钙的顺利进行。蔗糖和聚乙烯二醇能够改善冰冻切片的可塑性，对于脱钙标本至关重要。

脱钙和处理后的标本或置入液氮内骤冷，保存备用，或用

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

O. C. T 糊剂包埋后置入恒冷冰冻切片机连续切片(5～10μm)。

2)Krinstensen's 脱钙液

(1)配方:

甲酸钠	52.2g
甲酸	174.2ml
双蒸水	100.0ml

(2)配制方法:甲酸钠、甲酸分别溶于 500ml 水中后,混匀,4℃备用,可保存 2～3 月。

3. 牙齿标本低温脱钙冰冻切片的处理流程

1)流程一

牙齿拔除后生理盐水浸洗拭干

↓

PLP 固定液中固定 6～10h

↓

5%、10%、15%甘油磷酸盐缓冲液各洗涤 15min

↓

EDTA 脱钙液脱钙 5～7 周

↓

15%蔗糖、15%甘油 PBS, 6h

↓

20%蔗糖、10%甘油 PBS, 1h

↓

20%蔗糖、5%甘油 PBS, 1h

↓

20%蔗糖 PBS, 1h

↓

20%聚乙烯二醇溶液 10min

↓

O.C.T 糊剂包埋

↓

恒冷切片机制备 5～10μm 连续冰冻切片

以上步骤除脱钙和15%蔗糖、15%甘油PBS处理是在－5℃进行外，其余均在 4℃中进行。

2)流程二

牙齿拔除后生理盐水浸洗拭干

↓

4%多聚甲醛缓冲固定液固定，4℃ 24h

↓

制备牙齿磨片

↓

4%多聚甲醛缓冲固定液固定，4℃ 24h

↓

Krinstensen's 脱钙液脱钙，4℃ 2～3 周

（隔 2～3d 换液一次）

↓

流水冲洗 2～4h

↓

双蒸水浸洗过夜

↓

0.1mol/L PB，40℃ 24h

↓

32%蔗糖缓冲液内，4℃ 24h

↓

制备连续冰冻切片

若将切片制备为 50μ 厚，置于具有 pH7.4，0.01mol/L PBS 液的网格中备用，则可用于漂染。

牙齿标本经上述固定、脱钙之后，也可经系列酒精脱水，浸蜡包埋，制备石蜡切片。

4. EDTA 低温脱钙制备标本的注意事项

(1) 体积较大的牙齿可以在固定后，于低温环境下(如冰槽、冰壶等)用涡轮钻磨除部分牙釉质、涡轮机的冷却水最好置冰箱内预冷。标本体积越小，脱钙时间越短。

(2) 脱钙时应勤换脱钙剂，尽量缩短脱钙时间，才能使抗原活性的保存足以保证实验结果的成功观察，通常 2～3 天更换一次。

(3) 固定剂和脱钙剂的 pH 值均应严格控制在 7.1～7.4 之间，使之能更好地保存细胞表面抗原。

(4) 进行切片时，冰冻切片包埋剂(O.C.T 糊剂)应充分包埋整个牙体，使牙体周围包埋剂厚度基本一致，以避免切片过程中硬组织与牙髓组织分离。

(5) 为防止脱片，需进行载玻片预处理和涂粘附剂。

载玻片处理：载玻片必须经过清洁液浸泡 12～24h，流水充分漂洗后用蒸馏水洗 5 遍以上，浸泡于 95%酒精内 2h。再用洁净的绸布擦干或用红外线烤箱烤干，贮放备用。盖玻片很薄，必须缩短以上程序，清洁液浸泡只需 2h，流水冲洗或蒸馏水清洗时勿损伤玻片等。

5. 粘附剂

粘附剂的种类较多，常用的有铬矾明胶、树脂胶(又称白色乳胶)、甘油明胶、甲醛明胶等。

1）铬矾明胶液

（1）配方：

铬矾[$CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$]	0.5g
明胶	5.0
双蒸水	至 1 000ml

或含铬矾 0.01%，明胶 0.1%

（2）配制方法：在 1 000ml 的烧杯或烧瓶中，以 500～800ml 双蒸水加温溶解明胶（约 65℃），完全溶解并冷却后再加入铬矾。温度过高易使明胶烧糊，包被玻片时最好控制水温在 70℃，并过滤后使用。

配制的铬矾明胶可在 4℃保存。

为防止脱钙冰冻切片的牙体硬组织脱片，可采用铬矾明胶液双重粘附处理，即切片充分吹干后，用注射针头或毛细吸管吸取粘附剂（在 40℃以下），沿标本外缘和硬组织表面准确涂布一薄层，再充分吹干后进行染色。

2）白色乳胶　即木工用乳胶，或进口白色树脂胶，或国产聚醋酸乙烯乳胶液，浓度为 1%～2%，蒸馏水稀释即可。

甘油明胶混匀后涂在载玻片上，切片贴附后置有甲醛的干燥器皿内，加热至 80℃，1h。

3）甲醛明胶

（1）配方：

40%甲醛	2.5ml
明胶	0.5g
蒸馏水	至 100.0ml

（2）配制方法：用约 80ml 蒸馏水加热溶解明胶，待明胶完全溶化后，加入甲醛，将蒸馏水加至 100ml 混匀即可。

6. 牙髓组织标本的制备方法

1）取材　将新鲜拔除的离体牙立即在低温环境下沿着牙轴方向纵形劈开，轻巧、仔细、完整剥离出牙髓。体内牙齿，前牙可于舌面开髓，用拔髓针完整拔出牙髓；后牙可于咬合面制洞，开髓和揭去髓顶，手术切取冠髓。此种取材，难以准确辨别牙髓和牙体间的解剖位置关系，而且对牙髓组织多有损伤。

为充分保存组织的抗原性，牙髓标本离体后应立即作处理，或立即速冻，进行冰冻切片或立即用固定剂固定，进行脱水、浸蜡、包埋石蜡切片，如不能迅速制片，可贮存于液氮罐内或－70℃冰箱内备用。取出的牙髓立即用 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 洗去表面血污，用 O.C.T 糊剂包埋，液氮速冻，－80℃冻存备用。

2）固定　固定剂同上，固定时间依固定剂性能而定，在低温环境（4℃）进行，一般需 2～12h。

3）*石蜡切片的制备*　用于免疫细胞化学研究的石蜡制片与常规制片略有不同：①脱水、透明等过程需在 4℃下进行，以尽量减少组织抗原的损失。②在低温石蜡中包埋，即浸蜡，包埋过程中，石蜡温度保持在 60℃以下，以溶点低的软蜡为好。③石蜡切片应放入 37℃恒温箱过夜，经过这样的烤片可减少染色中脱片现象。④切片如需长期贮存，可存放于 4℃冰箱内备用。因牙髓组织块小，可用快速石蜡包埋切片，全过程只需约 4h。

石蜡制片的优点较多，如组织结构保存良好，结构清晰，抗原定位准确。但是，制片过程中经过酒精、二甲苯等有机溶剂处理，组织内抗原活性丢失较多。为了保存更多的抗原活性，可采取冰冻干燥包埋法（Freeze drying embedding

method)，即将新鲜组织低温速冻，利用冰冻干燥机在真空、低温条件下排除组织内水分，然后用甲醛蒸气固定干燥的组织，最后将组织浸蜡、包埋、切片，此法可用于免疫荧光标记、免疫酶标记及放射自显影等。

二、牙髓免疫细胞化学染色法

牙髓免疫细胞化学染色法可用免疫荧光法及酶桥法，后者即过氧化物酶抗过氧化物酶法（Perioxidase antiperoxidase method，PAP 法）等。

随着免疫细胞化学的广泛应用和迅猛发展，继荧光素、酶标记抗体技术后，70 年代，建立了非标记抗体酶法，包括酶桥法和 PAP 法。80 年代后，相继发现了多种亲合物质，如植物凝集素(Lectins)与糖结合物(Glacol conjngates)，葡萄球菌 A 蛋白(Staphylocal protein A，SPA)与 IgG，生物素(Biotin)与卵白素(Avidin)，激素、脂质与受体等。这些物质是一些有多价结合能力的物质，不但亲合物质之间有高度亲合力，而且可以与标记物如荧光素、酶、同位素、铁蛋白等相结合。利用两种物质之间相互结合的化学反应而进行的细胞化学检测称为亲合细胞化学(Affinity cytochemistry)。免疫细胞化学中引入亲合细胞化学，则可使其敏感性得到进一步提高，更有利于微量抗原或抗体在细胞和亚细胞水平的定位。其中卵白素-生物素免疫染色系统或称为抗生物素-生物素免疫染色法是目前牙髓免疫细胞化学研究中应用最普遍敏感性最高的染色法。

1. 抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物技术

抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物技术(Avidin bi-

otin-peroxidase complex technique，简称 ABC 技术，ABC 法)特点是利用抗生物素分别连接生物素标记的第二抗体和生物素标记的酶。第一抗体不被标记物所标记，生物素标记的第二抗体与 ABC 复合物相连接。复合物将过氧化物酶结合在生物素上，再将生物素-过氧化物酶连接物与过量的抗生物素蛋白反应而制备的，最后进行显色反应而使检测物定位。

在 ABC 法中，抗生物素作为桥连接于生物素标记的酶和生物素标记的抗体之间，而生物素标记的过氧化物酶分子又可作为桥连结抗生物素分子，于是形成了一个含有 3 个以上过氧化物酶分子的网络状复合物，使敏感性极大提高，较 PAP 法约高 20～40 倍，能显示 PAP 法所不能显示的抗原。由于 ABC 法敏感性高，第一抗体和第二抗体都可被稀释至尽可能的程度，减少了非特异染色，使其特异性强，背景染色淡；而且生物素与抗生物素具有多种示踪物结合能力，可用于双重或多重免疫染色；生物素-抗生物素染色药盒的商品化或 ABC 试剂的应用，使其方法简便，节约时间。

2. ABC 染色法的操作步骤

1)步骤一

取出牙髓恒冷冰冻切片，室温干燥 1h

↓

50%冷丙酮固定 30s

↓

100%冷丙酮固定 5min

↓

1%牛血清加 5%正常羊血清室温下作用 30min

↓

第一抗体，37℃湿盒孵育 1h

↓

生物素标记的第二抗体(1∶200)，37℃湿盒 45min

↓

0.3%H_2O_2-PBS 封闭内源性过氧化物酶，5min(暗室内)

↓

ABC 复合物(1∶200) 37℃湿盒孵育 45min

↓

0.05%DAB-0.01%H_2O_2-0.05mol/L Tris-HCl(pH7.6)

↓

镜下控制显色反应

↓

上述各步骤之后均用 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 振洗 3 次，每次各 5min

↓

苏木素轻度复染

↓

梯度乙醇脱水，二甲苯透明

↓

树脂封固、光镜观察

2)步骤二

将冰冻切片置于含 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 液网格内

↓

0.01%双氧水甲醇液室温下封闭 30min

↓

0.03% Triton-X-100 PBS 液室温下作用 30min

↓

第一抗体，4℃孵育 72h

↓

生物素标记的第二抗体(1∶200)室温孵育 4h

↓

ABC 复合物(1∶200)室温孵育 4h

↓

上述各步骤之后均用 0.01mol/L pH7.4 PBS 振洗 3 次，每次各 5min

↓

新鲜配制的 DAB-0.25%硫酸镍铵醋酸缓冲液

显色，镜下控制反应强度，适时终止显色

↓

裱片于明胶载玻片上自然凉干

↓

梯度乙醇脱水，二甲苯透明

↓

DPX 胶封固、凉干

↓

光镜下观察

以上步骤为漂染方式，适宜神经系统抗原分布研究。

3)步骤三

人牙拔除后立即劈冠，取出牙髓

↓

Bouin's 固定液 4h

↓

梯度乙醇脱水

↓

石蜡包埋

↓

石蜡切片，厚 4μm

↓

常规脱蜡、梯度乙醇至水

↓

3%H_2O_2 甲醇溶液去除内源酶

↓

正常血清孵育 15min

↓

第一抗体，4℃ 48h

↓

生物素标记的第二抗体，37℃ 1h

↓

ABC 复合物，室温 40min

(以上各步骤之后均用 pH7.4，0.01mol/L PBS 振洗 3 次，每次各 5min

↓

0.01%H_2O_2+DAB 溶液显色

↓

系列乙醇脱水、二甲苯透明

↓

DPX 胶封片

↓

光镜观察

阳性对照:已知抗原阳性的组织切片。

阴性对照:用正常血清稀释液代替第一抗体。

其余与上述步骤相同。

3. 注意事项

(1)石蜡切片需经脱蜡、系列乙醇至水。

(2)ABC 复合物的配制，生物素与抗生物素之比为 1∶4 时，能获最佳满意效果，即抗生物素 10μg/ml 加生物素 2.5μg/ml，应用 0.05mol/L Tris-HCl 液，pH7.6，在应用前 30min 配制。ABC 试剂保存温度以 4℃为佳。

(3)阳性、阴性对照同步进行上述染色，目的在于证实阳性结果的特异性，排除可疑的非特异性。

阳性对照是用已知的抗原阳性的切片与待检标本同时进行染色，对照片应为阳性结果，证明全过程符合要求。尤其当待检标本呈阴性结果时，阳性对照尤为重要。

阴性对照是用确证不含已知抗原的标本作对照，应呈阴性结果，为阴性对照的一种。其实空白、替代、吸收和抑制试验都属阴性对照。当待检标本呈阴性结果时，阴性对照就更加重要，用以排除假阳性。通常应用PBS或正常血清代替第一抗体，省去特异性第一抗体，以检查组织细胞与标记抗体或桥抗体之间有无非特异性第一抗体，为阴性对照。

三、牙髓免疫细胞化学染色的常用试剂

1. 缓冲液

1) 0.2mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液

(1)配方：

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

(2)配制：配时常分别配制 0.2mol/L 的 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 和 0.2mol/L 的 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，两者按一定比例混合即成 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液(PB)，根据需要还可配制不同浓度的PB和磷酸盐缓冲生理盐水(Phosphate buffered saline，PBS)。

0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$：称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.2g 或 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6g，加蒸馏水至1 000ml溶解。

0.2mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$：称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

71.632g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6g，或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6g，加双蒸水至 1 000ml 溶解。

0.2mol/L pH7.4 的 PB 配制：0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 19ml 和 0.2mol/L Na_2HPO_4 81ml，充分混合(pH7.4～7.5)。若 pH 偏高或偏低，可改变二者比例加以调整。室温保存。

2)0.01mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水

(1)配方：

0.2mol PB	50ml
NaCl	8.5～9g（约 0.15mol/L）
双蒸水	至 1 000ml

(2)配制：将0.2mol/LPB50ml和NaCl8.5～9g置入1 000ml 的容量瓶中，加双蒸水至 1 000ml，充分摇匀即可。若拟配制 0.02mol/L 的 PBS，则将 PB 量加倍即可。

PB 和 PBS 是免疫细胞化学实验中最为常用的缓冲液，0.01mol/L PBS 主要用于漂洗组织标本、稀释血清等，pH 值应在 7.24～7.35 之间。0.1mol/L 的 PB 常用于配制固定液、蔗糖等。通常，将 0.2mol/L PB 稀释成 0.01mol/L PBS 时，常可达到要求的 pH 值。

3)0.5mol/L pH7.6 Tris-HCl 缓冲液（Tris Buffered，TB)

(1)配方：

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	60.57g
1mol/L HCl	约 420ml
双蒸水	至 1 000ml

（2）配制：先以 300～500ml 双蒸水溶解 Tris，加入 HCl 之后再用 1mol/L HCl 的 NaOH 将 pH 调至 7.6，最后加双蒸水至 1 000ml。此液为储备液，4℃冰箱保存，常用的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液即为 10 倍稀释的储备液。该液主要用于配制 Tris 缓冲生理盐水、DAB 显色液等。

4) Tris 缓冲生理盐水

（1）配方：

0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液	100ml
NaCl	3.5～9 g(0.15mol/L)
双蒸水	至 1 000ml

（2）配制：先以少量双蒸水溶解 NaCl，再加 Tris-HCl 缓冲液，最后加双蒸水至 1 000ml，充分摇匀使 Tris 终浓度为 0.05mol/L。

Tris 缓冲生理盐水（Tris buffered saline，TBS）主要用于漂洗标本，常用于免疫酶技术。

5)Tris-PBS(Tris-PBS)

（1）配方：

TritonX-100	10ml(1%)
	或 3ml(0.3%)
0.5mol/L pH7.6 Tris-HCl 缓冲液	1 000ml
（或 0.2mol/L pH7.4 PB	50ml）
NaCl	8.5～9g
双蒸水	至 1 000ml

（2）配制：用少量双蒸水溶解 NaCl 后，加入 Triton-X-100 及 Tris 缓冲液或PB，最后加双蒸水至 1 000ml，充分混匀。

常用浓度为 1%及 3%，前者主要用于漂洗标本，后者主要用于稀释血清。

6)30% Triton-X-100(聚乙二醇辛基醚)

(1)配方：

Triton-X-100	28.2ml
0.01mol/L pH7.3 的 PBS	72.8ml
(或 0.05mol/L pH7.4 的 TBS	72.8ml)

(2)配制：将 Triton-X-100 与 PBS 或 TBS 混合，置 37～40℃水浴中 2～3h，使其充分混合。此液为储备液，常用浓度为 1%和 0.3%，临用时稀释即可。

Triton-X-100 是一种非离子型表面活性剂，是常用的去污剂，可溶解脂质，以增加抗体对细胞膜的通透性。常用 1%溶液漂洗组织标本。

2. 显色液

DAB 显色液(Diaminobenzidine，DAB，即 3,3-二氨基联苯胺，常用四盐酸盐)。

(1) 配方：

DAB	50mg
0.05mol/L TB	100ml
30%H_2O_2	30～40μl

(2)配制：先以少量 TB 溶解 DAB，然后加入余量 TB，充分摇匀，使 DAB 终浓度为 0.05%，过滤后显色前加入 30% H_2O_2 30～40μl，使其终浓度为 0.01%。

配时应注意：DAB 需完全溶解，否则未溶解的颗粒沉淀于标本上影响观察；DAB 浓度不宜过高，否则显色液呈棕色，增加背景染色；DAB 有致癌作用，操作时应戴手套，尽量避免

与皮肤直接接触，用后及时彻底冲洗，接触 DAB 的器皿应经洗液浸泡 24h 后使用。

3. 封固剂

1)甘油-TBS 或甘油-PBS

(1)配方：

①甘油	90ml
0.01mol/L TBS	10ml
②甘油	75ml
0.01mol/L PBS	25ml

(2)配制：分别将两组配方充分混合后，置 4℃冰箱，待气泡排除后方可使用。

2)甘油-明胶

(1)配方：

明胶	10g
甘油	12ml
蒸馏水	100ml
麝香草酚	少许

(2)配制：将明胶充分溶解于温热的蒸馏水中，过滤，再加甘油混合均匀，加麝香草酚少许是为了防腐。

3) DPX

(1)配方：

Distrenze	10g
酸二酊	5ml
二甲苯	35ml

DPX 现有商品出售，可直接应用，若过于粘稠，可加少量二甲苯稀释后应用，DPX 为中性封固剂，应用时尽量使其为

一薄层，以防组织收缩。

四、牙髓的免疫电镜技术

免疫电镜技术是免疫细胞化学与各种电镜技术结合，在高分辨力的水平上，定位细胞器等超微结构中的抗原而形成的技术。免疫细胞化学不仅可显示免疫反应中有关物质在超微结构中的定位，而且可以显示有关物质和超微结构之间的相互关系。在鉴定识别抗原物质的性质方面，为分子生物学水平研究提供可靠的依据，是当前发展免疫分子病理学重要的手段之一。近年，随着免疫细胞化学的发展，牙髓的免疫电镜研究也有了新的进展。牙髓免疫电镜技术的步骤有标本制备、免疫染色、电镜标本制作和电镜观察等。

1. 标本制备

标本选自需拔除的待检牙齿，拔除后将离体牙立即在低温下劈开，取出牙髓，置 PLP 固定液，4℃下固定 6～8h，液氮速冻后制作 30μm 冰冻切片，放入 0.01mol/L pH7.4 PBS 中漂洗待染。

2. 免疫染色

牙髓免疫电镜标本可采用包埋前 ABC 技术染色，全部染色过程均在小瓶内漂染，染色流程如下：

将冰冻切片置入含有.01mol/L pH7.4 PBS 液的网格

↓

第一抗体，室温微振 1h，4℃ 24h，摇动数次

↓

PBS 漂洗，4℃ 1h，换液数次

↓

生物素标记的第二抗体，室温下微振 1h，4℃ 4h

↓

0.03%H_2O_2～PBS 暗室内封闭 10min

↓

PBS 漂洗，4℃ 1h，换液数次

↓

ABC 复合物室温下振荡 10min，4℃ 4h

↓

0.05mol/L pH7.6 Tris-HCl 缓冲液漂洗 10min

↓

0.01% H_2O_2～Tris-HCl-DAB 镜下控制显色 15～20min

3. 电镜标本制作

低倍镜下挑选阳性着色部位，初步修整

↓

1% O_sO_4 固定 1h，PBS 漂洗过夜

↓

系列乙醇脱水，丙酮固定 10min

↓

丙酮加 Epon 812 环氧树脂包埋剂(1∶1) 15min

↓

纯包埋剂浸透 30min

↓

将样本置预置的包埋树脂柱上展平

↓

硅化玻璃片加压(100g)

↓

过夜，60℃聚合 48h

↓

将包埋柱置显微镜下，挑选阳性细胞、修整

↓

超薄切片

↓

柠檬酸铀染 2min，双蒸水洗

↓

醋酸铅染 2min，60℃烘干

↓

电镜观察

4. 注意事项

(1) 免疫电镜标本的取材要求迅速、精细。牙髓标本多为劈开牙齿取出牙髓。

(2) 免疫电镜标本的固定是一个重要问题，要求标本新鲜并迅速作适当固定，即可保存抗原的良好性能，又能保存细胞及抗原物质微细结构，固定剂的应用是根据抗原性保存的需要和超微结构的良好保存来选择。在众多的固定液中，过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液(PLP 固定液) 是首选的固定液，它能保存免疫球蛋白的抗原性及细胞的超微结构，但赖氨酸价格较高，不如多聚甲醛-戊二醛固定液经济、简便、效果佳。

(3) 包埋前染色，即先行免疫染色，在解剖显微镜下将免疫反应阳性部位取出，整修成小块，按常规电镜方法处理，经锇酸固定、脱水、包埋。如果特异性免疫反应的范围太小，为了准确定位，可作第二次包埋，即第一次包埋时将组织置于两层 Thermanox 塑料片之间，中央环氧树脂包埋，如夹心面包式，进行高温聚合，然后再在解剖显微镜下取观察部位作第二次包埋。包埋前染色的组织，以中层较为理想。

包埋前染色法特别适用于含抗原量较少的组织，其优点是：①切片染色前不经过锇酸后固定、脱水及树脂包埋等过程，抗原未被破坏，易于获得良好的免疫反应；②可在免疫反应阳性部位定位超薄切片，提高电镜下的检出率。

(4) 超薄冰冻切片也适合于牙髓免疫电镜研究，将组织置于 2.3mol/L 蔗糖液中，以液氮速冻，在冰冻超薄切片机上切片，切片厚度可略厚于常规树脂切片。由于冰冻超薄切片不需经固定、脱水包埋等步骤，直接进行免疫染色，所以抗原保存较好，兼有包埋前或后的优点。

(5) 牙髓免疫电镜实验时需进行对照试验。

第二节　原位杂交组织化学

原位杂交是将分子杂交与组织化学结合的方法，也称杂交组织化学（Hybridization histochemistry），细胞杂交（Cytological hybridization）或原位杂交组织化学（In situ hybridization histochemistry，ISHH）。它是用标记的 DNA 或 RNA 为探针，在原位检测组织内特定的 DNA 或 RNA 序列。其基本原理是：应用含有互补顺序的标记 DNA 或 RNA 片段，即探针，在适宜的条件下与细胞内的 DNA 或 RNA 形成稳定的杂交体。因而，根据所用的探针和靶核酸的不同，原位杂交可分为 DNA- DNA 杂交，DNA-RNA 杂交和 RNA-RNA 杂交三类。根据探针的标记物是否能直接被检测，原位杂交又可分为直接法和间接法。其中，直接法的探针是用放射性同位素、荧光素或一些酶标记探针与组织细胞内的靶核酸所形成的杂交体，可分别通过放射自显影、荧光显微镜或成色

的酶促反应直接显示。间接法的探针一般是用半抗原标记，最后通过免疫组织化学对半抗原定位，间接显示探针与组织细胞内靶核酸所形成的杂交体。

由于原位杂交中用于组织细胞内特定的DNA或mRNA顺序定位的特殊试剂是探针，因而在进行原位杂交技术之前必须制备探针和标记探针。核酸探针的制备是分子杂交的关键。根据核酸探针的核酸性质区分，探针的种类有DNA探针、RNA探针、cDNA探针、cRNA探针及寡核苷酸探针等。标记探针的方法很多，近年来，地高辛(Digoxigenenin，DIG)配基随机标记法标记的探针已广泛应用于原位杂交技术。与放射性标记相比，地高辛标记探针对人体无害，不受半衰期限制，探针可长期保存。与生物素标记相比，它不受组织细胞中内源性生物素的干扰，敏感性高。地高辛具有灵敏度和分辨率高，反应产物颜色鲜艳，反差好，背景染色低，制备探针可长期保存，对人体无害等优点。目前已有地高辛检测试剂盒，参考其说明书即可进行实验。如参照DIG DNA Labeling and Dection Kit说明书介绍的方法，用随机引物法将DIG标记的dUTR参入到基因探针上进行原位杂交。

原位杂交组织化学技术的基本方法为杂交前准备、杂交反应、杂交后处理和显示。

一、杂交前准备

杂交前准备包括取材、固定、标本制备、杂交前处理和预杂交。

1）标本的取材　同前。

2）组织的固定　在固定剂的应用和选择上需兼顾到三

个方面：保持细胞结构、最大限度地保持细胞内 DNA 和 RNA 水平，使探针易进入细胞或组织。DNA 是比较稳定的，mRNA 是相对稳定的，但易为酶合成和降解，RNA 却绝然不同，非常易被降解。因此，对于 DNA 的定位来说，固定剂的种类和浓度并不十分重要，相反，在 RNA 的定位上，如果使 RNA 的降解减少到最低限度，那么，固定剂的种类、浓度和固定时间则十分重要。为了避免组织中核酸的降解，保存组织的形态结构，以及增加组织的通透性，常需化学固定剂。化学固定剂有沉淀固定剂和交联固定剂两类，常用沉淀固定剂有乙醇、甲醇和丙醇等，交联固定剂有多聚甲醛、甲醛和戊二醛等。在众多的固定剂中，一般认为 4%多聚甲醛对采用 cRNA 探针检测 mRNA 的组织固定较为适宜。它既能有效地保存靶 RNA 和组织的形态结构，又可使组织具有一定的通透性。组织与固定剂的体积比，不应低于 1∶10，固定时间与上述免疫细胞化学法的固定时间相同。

组织固定后需用 PBS 漂洗，约 4～5h，每小时更换洗液，或过夜，而后再按常规进行石蜡包埋。如拟制冰冻切片，组织块则用含 15%蔗糖的 PBS 溶液漂洗 4～5h 或过夜。

3）原位杂交的标本制备　有石蜡切片、冰冻切片和细胞培养等。为防止细胞或细胞标本在杂交过程中脱落，载玻片需用酸或去污剂洗涤，清水充分淋洗后再用蒸馏水淋洗。洗涤后浸渍铬矾明胶液，干燥保存备用。

新鲜组织制备的冰冻切片，需先用固定剂固定（4%多聚甲醛固定 10min），然后置 37℃干燥 4h 或过夜后再行原位杂交。制成的石蜡切片置于52℃烤箱过夜，随即可进行原位杂交。

4）杂交前处理　主要指用交联固定剂固定的标本，尤其是福尔马林固定的石蜡切片标本，需经杂交前处理。其目的是提高组织的通透性，增加靶核酸的可及性，防止 RNA 或 DNA 探针与细胞、组织或载片之间的非特异性结合，从而增强信号，减低背景。其内容包括脱蜡、去污剂处理，蛋白酶处理，酸酐处理和酸处理，不含探针的杂交液孵育以及内源性酶抑制等步骤。

石蜡标本的脱蜡是先入二甲苯 37℃，30min，再转入新鲜二甲苯，室温 10min，然后经浓度逐渐下降的乙醇入水。

去污处理的常用去污剂是 Triton-X-100 脱蜡后切片先用 PBS 洗 2 次，每次 3～5min，接着将切片浸入含 0.2% Triton-X-100 的 PBS 内 15min，再用 PBS 洗 2 次。去污剂处理后可增加组织的通透性，利于探针进入组织细胞。

蛋白酶处理的常用蛋白酶是蛋白酶 K(Protenase K)、链霉蛋白酶(Pronase)和胃蛋白酶(Pepsin)。蛋白酶 K 溶液 37℃孵育 20～30min，浓度为 1μg/ml，用 0.1mol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液和 50mmol/L EDTA，pH8.0 配制。链霉蛋白酶溶液室温孵育 5min，浓度为 1～2mg/ml，溶于含 5mmol/L EDTA 的 0.05mol/L Tris-HCl pH7.6 缓冲液中，胃蛋白酶溶液 37℃孵育 15min，浓度为 0.4%(wt/vol)，溶于 0.01mol/L HCl。

为了终止蛋白酶消化反应并保持组织结构，通常需用 4%多聚甲醛再固定。在蛋白酶 K 消化后，多应用 0.1mol/L 的甘氨酸 PBS 清洗以终止消化作用。为了防止探针与组织中碱性蛋白之间的静电结合，减少非特异性染色，杂交前可用 0.25%乙酸酐或 0.2mol/L 稀盐酸处理 10min。

5)预杂交(Prehybridization) 是减低背景染色的有效手段。预杂交液是不含探针和硫酸葡聚糖(Dextran sulphate)的溶液，将组织切片浸入预杂交液中可达到封闭非特异性杂交点的目的，从而减低背景染色。

杂交前的准备是为杂交成功打下基础而获得满意实验结果的必要步骤，从而使其达到增加组织通透性的目的，在杂交反应中核酸探针能进入细胞或组织内并与靶核酸相结合。

二、杂交反应

杂交反应(Hybridization)是原位杂交中关键环节，在杂交反应中需注意以下几点。

(1)进行杂交反应的探针和靶核酸都必须是单链的。如果用双链DNA探针检测DNA，则探针和靶核酸都必须先解链或先变性，即将含有双链探针的杂交液加在组织标本上，再将载玻片加热至95℃ 5 ～15min，这样可使探针和靶DNA同时变性，变成单链的探针随之与靶DNA之间进行杂交反应。如果用单链的探针来检测靶RNA，一般不需要变性。

(2)进行杂交反应的杂交液除含一定浓度的标记探针外，还需含有较高浓度的盐、甲酰胺、硫酸葡聚糖、牛血清白蛋白及载体DNA或RNA等。杂交液中含较高浓度的Na^+可使杂交率增加；还可减低探针与组织标本之间的静电结合。甲酰胺可使杂交温度降低。杂交液中加适量甲酰胺(50%左右)，可避免因杂交温度过高而引起的组织形态破坏及标本脱落。硫酸葡聚糖(约占10%)能与水结合，从而减少杂交液的有效体积，提高探针的有效浓度，提高杂交率。在杂交液中加入牛血清白蛋白及载体DNA或RNA等，都是为了阻断探针与组

织结构成分之间的非特异结合，减低背景染色。杂交液的量要适当，以 10～20μl/片为宜。杂交液过量不仅造成浪费，而且易致盖玻片滑动脱落，或导致高背景染色等，影响杂交效果。

(3)掌握最佳探针浓度。在原位杂交反应中，探针的浓度远高于组织中靶核酸的浓度。根据国内外实验工作者的经验，掌握探针浓度的最佳原则应是用最低探针浓度达到与靶核苷酸的最大饱和结合度。这和在免疫组织化学试验中选择抗血清的最佳工作浓度的原则一样。最适宜的探针浓度应能获得最强的信号，同时背景染色低。最适宜的探针浓度要经预试验确定。通常放射性同位素探针的浓度为 0.5ng/μl，非放射性探针浓度为 2ng/μl。

(4)掌握杂交温度和时间。杂交温度应低于杂交体的融解温度 20～30℃。如所形成的杂交体的温度为 70℃，那么杂交温度应在 40～50℃。因为在这一温度条件下进行杂交，杂交率最高。能使 50%的核苷酸变性解链的温度叫解链温度或融解温度(Melting temperature，Tm)。原位杂交中，多数 DNA 探针需要的 Tm 是 90℃，而 RNA 需要 95℃，这种高温对保存组织形态完整和保持组织切片粘附于载玻片上是不可能的。因此，杂交液中需要常规加入 30%～50%甲酰胺。McConaughy 报道，反应液中每增加 1%甲酰胺浓度，Tm 可降低 0.72℃。当杂交液含 50%甲酰胺，盐浓度为 0.75mol/L 左右时，DNA 探针的温度约为 42℃，RNA 探针为 50～55℃，寡核苷酸探针约为 37℃。杂交反应的时间与核酸探针长度及组织通透性有关，需经反复实验而确定。通常可将杂交液和标本孵育过夜，但杂交反应时间不要超过 24h。反应时间过长，形成的杂交体会解链，杂交信号反而会减弱。非放射性原位杂交

探针浓度一般较高(2μg/ml),杂交反应的时间也较短,甚至30min即可得到充分反应。

三、杂交后处理

杂交后处理(Post hybridization treatment)包括系列不同浓度、不同温度的盐溶液的漂洗。洗涤盐溶液的浓度、温度、洗涤次数和时间因核酸探针的类型和标记物的种类不同而略有差异,通常盐溶液的浓度是由高到低,温度则由低到高。漂洗过程中切勿使切片干燥。杂交后漂洗的目的是除去未参与杂交体形成的过剩探针,除去探针与组织标本之间的非特异性结合,减低背景染色,达到理想的信噪比。

四、显示

显示(Visualization)是根据核酸探针标记物的种类分别利用酶检测系统进行显色处理或进行放射自显影显色处理,显色的方法因探针的标记物不同而异,显色后,细胞或组织的原位杂交切片均可进行半定量的测定,非放射性核酸探针杂交的细胞或组织可利用酶检测系统显色,然后利用显微分光光度计或图像分析仪对不同类型和数量的核酸的显色强度进行检测。放射自显影可利用图像分析检测仪(Computer-arristed image analysis)检测银粒的数量和分布。但对原位杂交进行半定量测定时必须注意严格控制实验的同一条件,如切片的厚度和核酸的保存量等。

五、原位杂交的对照试验

原位杂交的对照试验包括组织对照、探针对照、杂交反应

对照和检测系统对照在内的一系列阳性和阴性对照。对照试验的设置须根据核酸探针和靶核苷酸的种类和现有的可能条件去选择。例如不加探针的空白对照和预先将切片用DNA酶或RNA酶消化，然后用原位杂交组织化学(ISHH)技术证明丢失的DNA或RNA。如同免疫组化的吸收试验一样，事先与特异性的cDNA或cRNA进行杂交，再进行ISHH，其结果应为阴性。由于影响ISHH实验结果的因素太多，故对ISHH结果的解释应持慎重态度。

六、原位杂交组织化学与免疫组织化学双标记技术

原位杂交组织化学与免疫组织化学(IHC)可以结合进行。结合的方式有在相邻的切片上分别进行ISHH和IHC染色，也可先后在同一切片上进行ISHH和IHC染色。前者可使ISHH和IHC染色都获得理想的结果，易成功，但易产生空间误差和样本误差。后者是ISHH与IHC相结合的双标记技术，可避免相邻切片法观察时的不便，在相邻切片上用ISHH和IHC技术进行同一细胞内基因及其产物的定位，必须制备高质量的连续切片，使对比观察和结果分析更为确切。

在ISHH与IHC双标记技术中，固定剂的选择十分重要，选用的固定剂除了能保持组织细胞良好形态结构外，还要同时有利于抗原和靶核酸的保留，使之同时获得满意的免疫组织化学阳性反应和原位杂交信号。2%～4%多聚甲醛是mRNA原位杂交的常用固定剂，如果在此固定条件下被测抗原也能保持稳定，则可用于双标记技术。双标记技术实际是在同一切片上先后两次染色，但第一次染色总要或多或少的影响第二次染色，使第二次染色不十分理想。实践中往往首先

进行原位杂交染色，而后再进行免疫组织化学的染色，以这种次序进行标记更易于成功。

主要参考文献

1. 蔡文琴，王泊云主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科学技术出版社，1994
2. 郑一守，杨秀珍编著. 免疫细胞化学及其在生物学和医学上的应用. 南京：南京大学出版社，1990
3. 苏慧慈. 原位杂交. 北京：中国科学技术出版社，1994
4. 吴海珍，文玲英. 低温脱钙冰冻切片法在牙髓免疫组化中的应用. 上海口腔医学，1993,2(1):38～40
5. 吴海珍，文玲英，王泊云. 牙髓中HLA-Ⅰ类抗原的免疫电镜研究. 牙体牙髓牙周病学杂志，1993,3(3):160～161
6. 刘彦仿主编. 免疫组织化学. 北京：人民卫生出版社，1990
7. 吴海珍，文玲英，王泊云. 用免疫组化法对正常和炎症牙髓中免疫细胞的研究. 牙体牙髓牙周病杂志，1993,3(3):154～157